



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del aislamiento Rotaviral TRUY como potencial agente oncolítico en células tumorales de ovario

Luz Dary Gutiérrez Castañeda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Instituto de Biotecnología
Programa interfacultades de Doctorado en Biotecnología
Bogotá 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del aislamiento Rotaviral TRUY como potencial agente oncolítico en células tumorales de ovario

Luz Dary Gutiérrez Castañeda

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Biotecnología**

**Director:
Carlos Arturo Guerrero Fonseca. MD. MSc. PhD.**

**Línea de investigación:
Virus Oncolíticos
Grupo de investigación:
Biología Molecular de virus**

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Instituto de Biotecnología
Programa interfacultades de Doctorado en Biotecnología
Bogotá
2019

Trabajo dedicado a mi familia, mis hijos Juan Felipe y Juan Camilo, a mi esposo Juan de Jesús, a mis padres Flor y Lucio, todo ellos bellísimos resultados de las infinitas permutaciones en la evolución.

AGRADECIMIENTOS

Cada vez que se alcanza una de las metas que uno se propone a lo largo de su vida sería injusto no agradecer a todos aquellos que hicieron posible ese logro.

En primer lugar, agradezco a mi familia por la paciencia que me tuvieron durante estos 5 años, a mis hijos Juan Felipe y Juan Camilo por impulsarme y exigirme la prontitud (*..ya es hora señora...*), apoyarme en todo y por las largas esperas en las noches en la facultad de Medicina.... A Juancho por estar a mi lado y apoyarme en cada decisión.

A mis padres Flor y Lucio por el apoyo incondicional y quienes han sido mi mayor ejemplo de tenacidad y disciplina. A toda mi familia que son el motor de mi existir.

A mi director de Tesis Carlos Arturo Guerrero por acogerme en el Laboratorio de Biología Molecular del Virus, UNAL, para llevar a cabo este trabajo, por ayudarme a crecer académicamente, sus oportunas y pacientes críticas académicas y por creer en mí.

A Miguel, auxiliar de laboratorio de la UNAL, por su dedicación para ayudarnos a solucionar todos los problemas técnicos y de equipos.

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme entrar a hacer parte una vez más del grupo UNAL.

Al doctorado en Biotecnología por permitirme lograr una meta más en mi vida. En especial a la Dra. Sonia Ospina y al Profesor Jairo Cerón. Un agradecimiento muy especial a Raquel, secretaria del programa, por toda su ayuda administrativa, su guía y escucha cuando lo necesité.

A los amigos del doctorado Henry, el político del grupo. A Carlitos por aquellas discusiones de química, por permitirme compartir mis cuestionamientos. A Cata por los pocos momentos, pero muy valiosos dentro del laboratorio. A Dianita que, aunque llegaste en la última etapa de este trabajo, fuiste de gran apoyo. En fin, a todas las personas del laboratorio por la gran compañía en estos años de estudio.

A todos los compañeros del doctorado de biotecnología, Luisa, Marina y Cata

A la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud por el apoyo y permitirme desarrollar parte de mis trabajos en las instalaciones del Edificio de Ciencias Básicas. A todo el grupo de Ciencias Básicas por el apoyo, las risas y los chistes del “ROTA”, hacían un chiste de lo que para mí era una tragedia. A Lilian Torres, colega, por su apoyo incondicional. A David Tovar por su gran ayuda en el transporte de muestras y en el apoyo en el laboratorio. A Sonia y Marcela, auxiliares de laboratorio de la FUCS por su ayuda y la disposición para ayudarme en mis labores diarias.

A Daniel Sanabria, Ginecólogo Oncólogo, por su colaboración en la consecución de las muestras, ya que sin su apoyo y gestión hubiese sido imposible culminar este trabajo, por hacer parte de este equipo y su presteza por conseguir las muestras. A la Fundación Santa Fe por permitir la obtención de las muestras.

A las instituciones financiadores de este trabajo: Colciencias, el Doctorado en Biotecnología, el Laboratorio de biología molecular del Virus, Facultad de Medicina- UNAL, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud-FUCS.

Gracias a todas las personas que hicieron parte de este trabajo y que se me pasan en este momento.

RESUMEN

Durante las últimas décadas la terapia viral oncolítica ha sido reconocida como una nueva opción para el tratamiento del cáncer. Los virus oncolíticos (VO) son agentes terapéuticos que selectivamente pueden infectar, replicar e inducir muerte de la célula tumoral con mínimo impacto en la célula no tumoral. Este tropismo por células tumorales es dependiente de la expresión de receptores en la membrana, lo que le permite al virus la unión, la entrada y la replicación viral. Adicionalmente, los VO utilizan productos génicos virales que facilitan la evasión de la respuesta inmune, permiten el reconocimiento y penetración a la célula, e interactúan con la maquinaria celular para alterar los programas de muerte. Muchas de las vías celulares que los virus alteran son las mismas vías que se encuentran ya desreguladas en la célula tumoral y como consecuencia estas mismas vías son los blancos para el desarrollo de terapia antitumoral basada en virus. Los efectos antitumorales que se generan y las vías de señalización modificadas por el tratamiento con VO son dependientes de la especie del virus, las modificaciones genéticas del virus y el tipo de cáncer a tratar. Actualmente, muchos de los VO que se encuentran en ensayos clínicos tienen un tropismo natural para proteínas de superficie que son sobre expresadas en la célula tumoral o son modificados para que se unan directamente a un único receptor de la superficie celular. En el laboratorio de Biología Molecular del Virus de la Universidad Nacional de Colombia se ha venido trabajando en el estudio del potencial oncolítico de cinco rotavirus generados por evolución dirigida. Previamente, se demostró que estos virus utilizan las proteínas Hsc70, PDI e integrina $\alpha\beta 3$ como receptores en enterocitos y en líneas celulares tumorales y NO tumorales susceptibles. Uno de estos virus es el rotavirus TRUYO, el cual fue generado mediante pases continuos de cinco especies de rotavirus que infectan animales (TRF-cerdo, RRV-mono Rhesus, UK-bovino, YM-porcino y OSU porcino) en varias líneas celulares tumorales de origen humano que sobre expresan proteínas de choque térmico. En este trabajo se evaluó la capacidad oncolítica del rotavirus TRUYO en células de línea celular y cultivo primario obtenidos de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario, determinando la importancia de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, PDI, Hsc70, $\beta 1$ $\beta 2$ y $\beta 3$ durante el proceso infeccioso. Se encontró que el rotavirus TRUYO tiene la capacidad de infectar la línea celular MES-OV (ATCC), mediante el uso de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60, PDI e integrina $\beta 1$ y $\beta 3$. La entrada de este virus en las células MES-OV es mediada por endocitosis, posiblemente por macropinosoma. El ciclo de replicación encontrado fue de aproximadamente 8 horas y a las 12 h.p.i desencadena señales relacionadas con muerte por apoptosis.

Las proteínas de muerte que se encontraron con mayor expresión fueron la caspasa 3 y caspasa 8. Asimismo, se logró establecer nueve cultivos primarios obtenidos de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario, principalmente con fenotipo epitelial. Estas células fueron susceptibles y permisivas a la infección por rotavirus TRUYO. Se encontró heterogeneidad en el uso de las proteínas chaperonas, PDI e integrinas durante la entrada. Sin embargo, las proteínas que más con más frecuencia usó el virus para la entrada fueron la Hsp70, PDI, $\beta 1$ y $\beta 3$. Durante la infección en cultivo primario el virus indujo muerte celular mediante aumento en la permeabilidad de la membrana, exposición de la fosfatidilserina y aumento en la expresión de caspasa 3 fragmentada, Hsp60 y Hsp27. En conclusión, la susceptibilidad de las células tumorales de ovario a la infección por el rotavirus TRUYO dependen en parte por la presencia de las proteínas Hsps, PDI e integrina en la membrana celular, por lo cual se debe avanzar en la caracterización del potencial oncolítico del rotavirus TRUYO usando modelos in vivo de cáncer de ovario. Además, teniendo en cuenta los hallazgos en cuanto al uso de los receptores durante la entrada y el posible mecanismo por endocitosis, es importante evaluar cuál es el mecanismo usado por el rotavirus TRUYO durante los primeros eventos de la infección. Dado la diversidad de interacción entre el rotavirus TRUYO y las proteínas de la membrana celular evaluadas en este trabajo se sugiere que no es necesario la presencia de todas las proteínas para que el virus entre a la célula, sino que es posible que estas proteínas compartan una misma característica, ya sea funcional o estructural.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de ovario, Rotavirus, Oncolítico, Proteínas de choque térmico, integrina

ABSTRACT

In latest decades viral oncolytic therapy has been known as the novel cancer treatment. Oncolytic virus (OV) are therapeutic entities that can infect, replicate and induce death by lysis in tumoral cells with no relevant affection in normal cells. This tropism for tumoral cells is dependent on the receptor's expression in the membrane that allows attachment, entry and viral replication. OVs also use genetic tools that allows them immune response evasion, cell's recognition and internalization, that also allows it to interact with cell death machinery and disturbs it. Many of the routes that virus disturbs are the same that are already deregulated in tumoral cells, and therefore these routes are target for antitumoral therapy based on OVs. Antitumoral effects generated and signaling routes modified because of OV treatment are dependent of virus specie, genetic modifications and cancer type to treat. Nowadays, many of the OVs that are in clinic trials have a natural tropism for surface proteins already overexpressed in tumor cell or are modified to bounding to a specific receptor.

Virus Molecular Biology laboratory of Universidad Nacional de Colombia has been working on oncolytic potential of five rotavirus generated with directed evolution. Previously, it has been shown that these viruses use Hsc70, PDI, and $\alpha\beta3$ as receptors in enterocytes as well as in tumor and nontumoral susceptible cell lines. One of these viruses is TRUYO rotavirus, that it was generated with continuous passing of five animal infecting rotavirus (TRF-porcine, RRV-mono Rhesus, UK-bovine, YM-porcine, and OSU-porcine) in different human tumor cell lines that were overexpressing heat shock proteins. In this job, it was evaluated its oncolytic ability in cell line and primary culture cells coming from tumoral tissue of patients with ovarian cancer, determining the importance of Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, PDI, Hsc70, $\beta1$ $\beta2$ and $\beta3$ proteins during infection process. It was found that TRUYO rotavirus has the ability of infecting MES-OV (ATCC) cell line, through Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60, PDI and integrins $\beta1$ y $\beta3$.

Virus entry in MES-OV cells is endocytosis mediated possibly by macropynosome. Replication cycle was found to be Aprox. 8 hours, and at 12 h.p.i cells release apoptosis related signals. Caspase 3 and 8 (death proteins) were found with greater expression.

Likewise, it could be established primary culture of nine tumoral tissue of patients with ovarian cancer, primarily of epithelial phenotype. These cells were susceptible and permissive to TRUYO rotavirus infection. Heterogeneity use of chaperones proteins, PDI and integrins were found in virus entry. Nevertheless, Hsp70, PDI, β 1 and β 3 were the most frequent proteins in use. During primary culture infection, virus was capable of inducing death by means of membrane's permeability, phosphatidylserine exposition and clivated caspase 3, Hsp60 and Hsp27 overexpression. In conclusion, susceptibility of ovarian tumoral cell to TRUYO infection depends on Hsps, PDI and integrins expression on cell membrane, so it will be needed to move on TRUYO rotavirus oncolytic potential characterization using ovarian cancer models in vivo. Also, having in mind the receptors used during virus entry and probably endocytosis mediated entry, it is important to evaluate the mechanism used during early infection events. Given the diversity interaction between rotavirus TRUYO and cell membrane's proteins evaluated in this job it is suggested that the presence of all proteins is not needed for virus entry, but it is possible that these proteins share a same function or structure characteristic.

Key words. Ovarian Cancer, rotavirus, oncolytic, heat shock proteins, integrin.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| 1. CAPITULO 1. ESTADO DEL ARTE | 19 |
| 2.1 Virus oncolíticos | 19 |
| 2.1.1 Viroterapia oncolítica | 19 |
| 2.1.2 Recomendaciones del comité ICH..... | 21 |
| 2.2 Rotavirus..... | 22 |
| 2.2.1 Aspectos generales..... | 22 |
| 2.2.2 Morfología y estructura..... | 22 |
| 2.2.3 Genoma | 23 |
| 2.2.4 Ciclo de replicación del <i>Rotavirus</i> | 25 |
| 2.2.5 Mecanismos de muerte relacionados con proteínas de rotavirus..... | 31 |
| 2.3 Cáncer de Ovario..... | 32 |
| 2.4 Integrinas | 34 |
| 2.4.1 Integrinas y cáncer de ovario..... | 34 |
| 3 CAPITULO 2. MARCO CONTEXTUAL..... | 36 |
| 3.1 Antecedentes | 36 |
| 3.2 Formulación del problema | 37 |
| 3.3 Justificación | 37 |
| 3.4 Hipótesis de trabajo | 39 |
| 3.5 Objetivos..... | 39 |
| 3.5.1 Objetivo general | 39 |
| 3.5.2 Objetivos específicos | 39 |
| 4. CAPITULO 3. RESULTADOS LÍNEA CÉLULAR | 40 |
| 4.1 CARACTERIZACIÓN DE ROTAVIRUS ADAPTADO (TRUYO). | 40 |
| 4.1.1 Determinación del genotipo análisis de secuencia de rotavirus y TRUYO. | 40 |
| 4.1.1 Resultados de la caracterización molecular del rotavirus | 40 |
| 4.2 ACTIVIDAD ONCOLITICA DEL ROTAVIRUS TRUYO EN LA LINEA CELULAR MES-OV | 41 |
| 4.2.1 Contextualización | 41 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.2.2 | Materiales y métodos | 43 |
| 4.2.3 | Resultados | 54 |
| 4.2.4 | Discusión..... | 68 |
| 4.2.5 | Conclusión..... | 74 |
| 5. | CAPÍTULO 4. RESULTADOS EN MUESTRAS OBTENIDAS DE PACIENTES | 75 |
| 5.1 | EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE ROTAVIRUS TRUYO EN CULTIVOS PRIMARIOS OBTENIDOS DE CÁNCER DE OVARIO. | 75 |
| 5.1.1 | Contextualización..... | 75 |
| 5.1.2 | Materiales y métodos..... | 76 |
| 5.1.3 | Resultados..... | 85 |
| 5.1.4 | Discusión. | 97 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 100 |
| 7. | RECOMENDACIONES..... | 102 |
| 8. | PRODUCTOS ASOCIADOS A LA TESIS..... | 103 |
| 8.1 | CAPACITACIÓN. | 103 |
| 8.2 | ASISTENCIA A CONGRESOS. | 103 |
| 8.3 | MANUSCRITO ACEPTADO | 103 |
| 8.4 | MANUSCRITOS SOMETIDOS | 103 |
| 9. | APORTES AL GRUPO | 104 |
| 10. | APORTES AL CONOCIMIENTO | 105 |
| 11. | HIPÓTESIS PARA TRABAJOS FUTUROS..... | 106 |
| 12. | REFERENCIAS..... | 128 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1 CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA DE ROTAVIRUS, LOCALIZACIÓN Y FUNCIONES DE PROTEÍNAS CODIFICADAS, ADAPTADO DE LA ESPECIE RF DE ROTAVIRUS (G6P6(1))..... | 23 |
| TABLA 2 RECEPTORES CELULARES Y PROTEÍNAS DE UNIÓN QUE PARTICIPAN EN LA ADHESIÓN Y UNIÓN | 27 |
| TABLA 3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS PACIENTES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO Y CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LAS CÉLULAS. | 86 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| FIG. 1 ESTRUCTURA DEL ROTAVIRUS. EN LA FIGURA SE MUESTRA UNA ELECTROFORESIS CON LOS 11 SEGMENTOS QUE HACEN PARTE DEL GENOMA Y LAS PROTEÍNAS QUE CODIFICAN.. | 23 |
| FIG. 2 CICLO DE REPLICACIÓN DEL ROTAVIRUS. | 25 |
| FIG. 3 INTERACCIONES DEL ROTAVIRUS–RECEPTORES SUPERFICIE DE LA CÉLULA DURANTE EL PROCESO DE ENTRADA. A.. | 30 |
| FIG. 4 SUSCEPTIBILIDAD, CINÉTICA DE REPLICACIÓN Y PERMISIVIDAD DE LA LÍNEA CELULAR MES-OV DE CÁNCER DE OVARIO A LA INFECCIÓN POR RV TRUYO. | 55 |
| FIG. 5 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO 90, 70, 60, HSC 70, PDI, B1 AND B3 SON LOCALIZADAS EN LA SUPERFICIE CELULAR DE CÉLULAS MES-OV. | 57 |
| FIG. 6 LAS PROTEÍNAS HSP90, HSP70, HSP60, PDI, HSC70 PARTICIPAN EN LAS PRIMERAS FASES DE INFECCIÓN DEL RV TRUYO EN MES-OV. | 59 |
| FIG. 7 LA INFECCIÓN DE ROTAVIRUS TRUYO DEPENDE DE LA LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN BALSAS LIPÍDICAS. DETECTION OF HSP90, HSP70, HSP60, PDI, HSC70 PROTEINS IN LIPID RAFTS. | 61 |
| FIG. 8 LOCALIZACIÓN DE LA PARTICULAR VIRA Y | 64 |
| FIG. 9 EL ROTAVIRUS TRUYO USA LA VÍA ENDOCÍTICA PARA LA ENTRADA. A. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE MICROSCOPIA CONFOCAL. | 65 |
| FIG. 10 EL ROTAVIRUS TRUYO GENERA EFECTOS CITOTÓXICOS EN LAS CÉLULAS MES-OV. | 67 |
| FIG. 11. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ONCOLÍTICO DEL ROTAVIRUS TRUYO EN CULTIVOS PRIMARIOS OBTENIDOS DE FRAGMENTOS DE TUMOR DE PACIENTES CON CÁNCER DE OVARIO. | 78 |
| FIG. 12 EXPRESS PRIMARY CULTURE MESENCHYMAL AND EPITHELIAL MARKERS. | 87 |
| FIG. 13 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HSP90, HSP70, HSP60, HSC70 PDI E INTEGRINAS B1, B2 Y B3 EN LA SUPERFICIE EN CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMOR DE OVARIO. | 88 |
| FIG. 14 LOS CULTIVOS PRIMARIOS OBTENIDOS DE TUMOR DE OVARIO SON SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN POR RV TRUYO. | 90 |
| FIG. 15 EL RV TRUYO USA LAS PROTEÍNAS HSP90, HSP70, HSP60, HSC70, PDI E INTEGRINA B1 DURANTE LOS PRIMEROS EVENTOS DE INFECCIÓN. | 95 |
| FIG. 16 LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL ROTAVIRUS TRUYO EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE OVARIO ESTÁ RELACIONADA CON APOPTOSIS. | 97 |
| FIG. 17 PROPUESTAS PARA EL MECANISMO DE ENTRADA DEL ROTAVIRUS TRUYO. | 101 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| ANEXO 1 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE ROTAVIRUS TRUYO | 107 |
| ANEXO 2 PORCENTAJE DE IDENTIDAD EN LA BASE DE DATOS ROTAC..... | 120 |
| ANEXO 3. GENOTIPOS DE ROTAVIRUS TRUYO | 121 |
| ANEXO 4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE VP1, VP3 Y VP3..... | 122 |
| ANEXO 5. ELECTROFEROTIPO DE ROTAVIRUS TRUYO. | 123 |
| ANEXO 6. PERFILES DE CITOMETRÍA PARA VIMENTINA Y CK8/18 DE MUESTRAS DE PACIENTES | 124 |
| ANEXO 7. EPI-INMUNOFLUORESCENCIA PARA LAS PROTEÍNAS HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, Hsc70, PDI, B1, B2 Y B3 EN 9 CULTIVOS PRIMARIOS..... | 125 |

INTRODUCCION

El cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial. De acuerdo a la agencia internacional para la investigación del cáncer, IARC en el año 2018 se presentaron 14 millones de nuevos casos y una mortalidad de 8.2 millones (1). El cáncer de ovario (CO) es la séptima causa de muerte en mujeres. En el año 2018 se diagnosticaron 295.414 casos y se presentaron 184.799 muertes relacionadas con esta enfermedad a nivel mundial (C56) (1). Esto muestra al CO como la malignidad con más alta razón entre morbilidad/mortalidad. En mujeres con diagnóstico confinada al ovario, el tratamiento con cirugía es curativo en más del 90 % de los casos (2). Pero la mayoría la mayoría (>75%) de pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados, con enfermedad metastásica dentro de la cavidad peritoneal y órganos vecinos (3). El tratamiento estándar para el CO, cuando es diagnosticado por primera vez, es la combinación de cirugía citoreductiva y quimioterapia basada en cisplatino. Sin embargo, la mayoría de pacientes con CO desarrollan resistencia y presentan enfermedad recurrente dentro de 3 años y mueren en menos de 5 años al diagnóstico (4). Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que puedan ser usadas como monoterapia o terapia adyuvante que permitan mejorar la sobrevida en estos pacientes.

Durante la transformación maligna, se desregulan diversas proteínas que contribuyen a diferenciar la célula normal en los diferentes subtipos histológicos y moleculares del CO. Por ejemplo, las proteínas integrinas, las cuales son receptores heterodiméricos de la superficie celular y participan en las interacciones de forma bidireccional entre el microambiente extracelular y el interior de la célula son reguladas de forma positiva y negativa (3, 5). Estas proteínas contribuyen a la progresión y metástasis debido a que inducen incremento en la migración, invasión y proliferación de la célula tumoral (6). También inducen la expresión de metaloproteinasas, las cuales a su vez rompen la proteína E-cadherina generando pérdida de las interacciones célula-célula. Las células desunidas como única célula o en agregados celulares son transportadas a lo largo del peritoneo a través de la cavidad peritoneal y pélvica para colonizar sitios distantes (3). Otras proteínas relacionadas con la carcinogénesis y ampliamente expresadas en células tumorales, son las proteínas de choque térmico (Hsp's) (7). Estas proteínas se clasifican en diferentes familias según su peso molecular (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y las Hsps pequeñas) (8). Son chaperonas moleculares y regulan la homeostasis y supervivencia celular en condiciones fisiológicas normales. Varias de estas proteínas son expresadas de forma constitutiva pero en condiciones de estrés celular son rápidamente inducidas mediante mecanismos de transcripción y

traducción (9). En células tumorales se ha detectado sobreexpresión de las proteínas Hsp's debido al estrés celular generado durante el proceso de carcinogénesis (7, 10). Adicionalmente, se ha correlacionado su expresión con la transformación y progresión maligna (11-13). Esta característica hace atractiva a estas proteínas como blancos moleculares para generar alternativas terapéuticas.

El uso de virus para tratar el cáncer ha ganado gran interés en las últimas décadas debido al mejor conocimiento del microambiente tumoral, la biología viral y la genética molecular tanto del virus como del tumor (14). La eficacia y seguridad de los VO ha sido mostrado en pruebas preclínicas (15-18) y clínicas (19). Las pruebas clínicas con VO como monoterapia han mostrado evidencia de respuesta antitumoral (20). Sin embargo, se ha encontrado que la liberación y penetración de los virus dentro de los tumores sólidos por administración sistémica presentan una serie de barreras en el torrente circulatorio o en el tumor dependiendo del tipo de virus. Las barreras del torrente circulatorio incluyen la presencia de células sanguíneas, de proteínas del complemento, de citoquinas antivirales, captación viral por otros tejidos y anticuerpos neutralizantes preexistentes (21). Una vez el virus ha alcanzado el tumor este debe infectar la célula tumoral mediante uso de receptores específicos, replicarse y luego diseminarse (22-25). Muchos de los VO que se encuentran actualmente en ensayos clínicos y preclínicos tienen un tropismo natural para proteínas de superficie que son sobre expresadas en la célula tumoral o algunos son modificados para que se unan de forma directa a un único receptor de la superficie celular (14). Sin embargo, el uso de receptores específicos limita el número de tumores candidatos a ser tratadas por cada VO. Por esto es importante diseñar y/o seleccionar virus oncolíticos que durante la infección de células tumorales usen receptores de membrana que se encuentren expresados en varios tumores y en alta densidad en la superficie de la membrana de la célula tumoral.

El *Rotavirus* (RVs) es el agente etiológico causante de la gastroenteritis en neonatos e infantes. Causa entre 600.000 a 870.000 muertes alrededor de todo el mundo y afecta especialmente a las ciudades que están en vías de desarrollo donde los pacientes no reciben una adecuada atención médica. La infección ocurre principalmente en el enterocito apical del intestino medio (26-28). La infección por los RVs es un proceso de múltiples pasos que involucra adhesión, penetración, transcripción y traducción, formación del viroplasma, replicación del genoma, maduración y liberación (29). La mayoría de los RVs estudiados requieren para el paso de adhesión la región terminal o subterminal del ácido siálico (30). Se ha descrito que algunas especies pueden unirse también al antígeno histogrupos tipo A. Después de la unión inicial varias proteínas pueden actuar como correceptoras del rotavirus. Se ha descrito la interacción con varias proteínas heterodiméricas integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, las cuales

interactúan con motivos ligandos en VP5 o VP7 (motivo DGE en VP5 o RGD en VP7) o con la proteína de choque térmico Hsc70 (31, 32). Se ha demostrado también que algunas especies de rotavirus utilizan las proteínas Hsc70, PDI e integrina $\alpha\beta 3$ como receptores en enterocitos y en líneas celulares tumorales y NO tumorales susceptibles (33-36). Teniendo en cuenta esta característica de los RVs, en el laboratorio de biología molecular del virus de la Universidad Nacional de Colombia (LBVUNAL) se generaron cinco rotavirus por medio de evolución dirigida con el objeto de ser usados como VO (37). Uno de estos virus es el rotavirus TRUYO, el cual se generó por pases continuos de cinco especies de rotavirus que infectan animales (TRF-cerdo, RRV-mono Rhesus, UK-bovino, YM-porcino y OSU porcino) en varias líneas celulares tumorales de origen humano que sobre expresan proteínas de choque térmico (38). Esta mezcla condujo a la generación de un virus con características diferentes, lo cual fue demostrado por electroferotipo y por la capacidad de infectar células tumorales (37, 39-41). Este aislado rotaviral ha sido evaluado en diversas líneas celulares tumorales en donde se ha demostrado mediante experimentos de bloqueo con anticuerpos específicos que utiliza las proteínas HSc70, PDI y la integrina $\alpha\beta 3$ durante la infección, lo que lleva a sugerir que puede ser usado como VO en tumores que expresen estas proteínas (38-41).

En el presente trabajo se caracterizó molecularmente el rotavirus TRUYO mediante análisis de secuencia de nueva generación. La distribución de los segmentos y las mutaciones generadas durante la adaptación en líneas celulares tumorales genero un virus con el genotipo I2-R2-C3-M2-A3-N2-T7(6)-y Ix-Rx-C2-M2-A9-Nx-T3. El análisis filogenético mostró una relación más cercana con rotavirus bovino y de simio. Indicando que las especies que predominaron durante la adaptación fueron las especies UK y RRV, sin embargo, se encontraron segmentos de los genes de las otras especies, lo que podría indicar recombinación de segmentos génicos. No se logró obtener la secuencia total del rotavirus. Por ejemplo, en el análisis no se detectó la secuencia del segmento 9 el cual codifica para la proteína VP7.

El potencial oncolítico del rotavirus TRUYO fue confirmado en nueve cultivos primarios obtenidos de tejidos tumorales de pacientes con cáncer de ovario y la línea celular MES-OV (ATCC). Las proteínas de choque térmico Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, la proteína PDI y las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$, se expresan de forma heterogénea en los cultivos primarios obtenidos. Mediante el ensayo de ELISA de captura y co-inmunoprecipitación se detectó que estas proteínas se unen al rotavirus TRUYO y el bloqueo de las mismas proteínas disminuyen la infección en diferentes porcentajes. Mediante microscopia confocal y análisis del coeficiente de correlación de Pearson y el porcentaje de solapamiento de Mander's se identificó que el rotavirus TRUYO colocaliza con estas proteínas en diferentes grados. Así mismo, se

encontró que colocaliza con Rab5 y mediante microscopia electrónica de barrido se encontraron estructuras compatibles con macropinosomas, indicando que es probable que este virus entra por medio de endocitosis mediada por macropinocitosis.

Con los hallazgos encontrados en este trabajo se muestra que el rotavirus TRUYO usa las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, la proteína PDI y las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ durante los primeros eventos de la infección en células de tumor de ovario. Es necesario seguir avanzando en la caracterización de este virus como VO, por lo tanto, se sugiere realizar experimentos *in vivo* en modelos que validen el tumor de ovario. Así como también es necesario conocer si existe un mecanismo específico para la entrada del rotavirus TRUYO, ya que en este trabajo se muestra que las proteínas evaluadas participan de forma heterogénea durante la entrada, pero no se realizaron experimentos que permitieran conocer el mecanismo funcional. Con los resultados encontrados en este trabajo se sugiere que estas proteínas comparten una característica funcional o estructural, o que estas proteínas presentan modificaciones postraduccionales que hacen que el rotavirus TRUYO se una a ellas, y una vez se da la unión, debe presentarse un mecanismo que permita su internalización. Esto es basado en que es necesario que las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI, $\beta 1$ y $\beta 3$ estén presentes en la membrana celular (determinado por el experimento de bloqueo), pero independiente del porcentaje de expresión de cada proteína en los cultivos primarios, el rotavirus TRUYO tiene la capacidad de entrar. Adicionalmente, no se logró establecer una correlación directa entre el porcentaje de expresión de ninguna de las proteínas celulares y el porcentaje de infección.

1. CAPITULO 1. ESTADO DEL ARTE

2.1 Virus oncolíticos

Los virus oncolíticos (VO) son agentes terapéuticos que selectivamente pueden infectar, replicar e inducir muerte de la célula tumoral con mínimo impacto en la célula no tumoral (20). Este tropismo (oncotropismo) es dependiente de la expresión de receptores de membrana en la célula tumoral que le permiten la unión, la entrada y la replicación viral (42). Adicionalmente, los VO utilizan productos génicos virales que facilitan la evasión de la respuesta inmune, permiten el reconocimiento y penetración a la célula, e interactúan con la maquinaria celular para alterar los programas de muerte (43). Muchas de las vías celulares que los virus alteran son las mismas vías que se encuentran desreguladas en la célula tumoral y como consecuencia estas mismas vías son los blancos para el desarrollo de terapia antitumoral (44-47).

Los VO pueden ser virus tipo silvestre o virus atenuados naturalmente que tienen la capacidad de infectar, replicar y lisar células tumorales. Otros VO son virus que han sido modificados genéticamente con el objetivo de generar deleciones o inserciones de segmentos genéticos para atenuar su virulencia. Los VO presentan básicamente cuatro modificaciones: 1. Deleción de genes virales codificantes necesarios para replicación en células normales, 2. El control de la expresión de genes de expresión temprana por uso de promotores tejido específico, 3. Cambio del tropismo viral por inserción de segmentos que codifican proteínas de unión a receptores e 4. Incorporación de transgenes dentro del genoma viral.

2.1.1 Viroterapia oncolítica

La viroterapia es una aproximación terapéutica para el cáncer, que se basa en el uso de VO (48). Esta se ha desarrollado desde el uso de virus cultivados "*in vitro*" (VO de primera generación) durante los años 1950 a 1960, pero debido a la toxicidad generada por algunos virus tipos silvestre, la eficacia fue limitada. Los avances en biología molecular permitieron la modificación genética de algunos virus, con el objetivo de eliminar los genes relacionados con la virulencia (VO de segunda generación) y en las

últimas décadas se han desarrollado VO que expresan genes o “virus armados” (virus de tercera generación). (49-51).

Las pruebas clínicas han demostrado que la terapia oncolítica presenta un mejor perfil de seguridad con menor toxicidad comparada con la quimio y radioterapia (52, 53). La viroterapia tiene como principal ventaja la selectividad del virus por las células tumorales sin infectar las células normales (48). La aumentada expresión de receptores de membrana, alteración de la respuesta antiviral, la elevada actividad metabólica, la desregulación del ciclo celular, la hiperactivación de vías mitogénicas y de apoptosis han sido relacionadas con esta selectividad (42, 54, 55). Algunos de los virus usados en pruebas preclínicas y clínicas son oncotrópicos por naturaleza y otros han sido modificados para inducir la infección en la célula tumoral (56). La selectividad de los virus oncotrópicos por la naturaleza es debida en gran parte a la sobreexpresión de proteínas receptores de membrana específicas en la célula tumoral, lo que permite una mayor capacidad de infección comparada con la célula no tumoral. Por otro lado, en algunos virus modificados se incluyen segmentos que codifican para proteínas que interactúan con receptores en la membrana de la célula tumoral (57-59). Después de la infección en la célula tumoral, el virus genera proteínas citotóxicas, apropiación de la maquinaria de síntesis de proteínas celular para su replicación, lo que conlleva a lisis celular y liberación de viriones capaces de infectar nuevas células neoplásicas dentro del microambiente tumoral (60, 61). Además de los receptores en la membrana celular, la magnitud de la lisis celular depende también del tipo de virus, la dosis viral y la susceptibilidad de las células tumorales a los diferentes tipos de muerte (14).

También actualmente se le ha atribuido a los VO, la capacidad de inducir inmunidad antitumoral sistémica. Seguida la oncolisis, se liberan antígenos asociados a tumor, patrones moleculares asociados a daño (DAMP) y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), los cuales cambian el microambiente tumoral inmunosupresor e inducen una respuesta inmune adaptativa sistémica, lo que finalmente lleva a regresión del tumor en sitios distantes que no han sido expuestos al virus (14). La liberación de estas moléculas ha mostrado que el VO induce muerte celular inmunogénica (62). Esto ha potencializado su uso como una nueva forma de inmunoterapia.

Debido a que la mayoría de los ensayos con VO que demuestran su actividad oncolítica se han desarrollado en estudios “*in vitro*”, la extrapolación a estudios clínicos ha mostrado limitaciones (63). Los obstáculos más importantes para la monoterapia con VO han sido: la respuesta inmune antiviral

generada por el huésped, las barreras extracelulares para la diseminación viral y la ineficiente interacción ligando-receptor en las células blanco (64). La respuesta inmune es una de las mayores limitaciones debido a que afecta la liberación y diseminación de los VO (65, 66), como también por la presencia de anticuerpos contra los virus preexistentes huésped que pueden neutralizar el VO antes de llegar al sitio blanco (32). Sin embargo, debido a que se ha identificado que los VO inducen respuesta inmune adaptativa, estos han sido usados en combinación con inhibidores del punto de chequeo inmunológico, o modificados con transgenes que estimulan la respuesta inmune lo que ha mostrado mayor efectividad (67, 68). Por otro lado, el microambiente tumoral también ha mostrado un papel determinante en la diseminación viral. El microambiente tumoral es definido por la interacción entre la heterogeneidad celular, el tamaño del tumor, la densidad de la capa de tejido conectivo intratumoral, la elevada presión intersticial y la baja permisividad de la vasculatura a la diseminación de VO (42).

De forma general, los resultados de evaluaciones en modelo animal y ensayos clínicos en humano soportan varios aspectos: 1. los VO pueden administrarse de forma sistémica por vía intravenosa para tratamiento de enfermedad metastásica; 2. las barreras físicas que limitan la diseminación del virus por vía intravenosa pueden ser superadas por la administración escalada de dosis o variación en la cantidad de virus administrada en los pacientes; 3. las células tumorales no son las únicas dianas terapéuticas de muchos virus oncolíticos, debido a que el VO debe interactuar y superar diferentes barreras antes de alcanzar el nicho tumoral, y 4. la respuesta inmune actúa no solo como barrera que limita la diseminación del virus por la generación de una respuesta inmune innata y adaptativa que neutralizan y disminuyen la replicación y diseminación del virus, sino que también puede actuar en conjunto con el VO para inducir en el huésped una respuesta antitumoral que permite la erradicación del tumor (69).

2.1.2 Recomendaciones del comité ICH

Con el objetivo de regular el uso de virus oncolíticos y conociendo los riesgos que pueden generar los virus competentes en replicación, las autoridades regulatorias representadas por ICH ("*The international conference on harmonisation of technical requirement for registration of pharmaceuticals for human use*") generó una guía en 2009 y fue actualizado en el año 2012 donde identifica los principios que deben tenerse en cuenta para el diseño de VO. Dentro de los requisitos que se deben evaluar en ensayos preclínicos se encuentran: evaluación de la capacidad infectiva, la selectividad, conocimiento de las variantes moleculares, modelos animales adecuados para evaluación in vivo, ensayos de farmacología, biodistribución y evaluación de la excreción viral, ensayos de toxicología y estudios de seguridad

terapéutica, como también estudios de buenas prácticas de laboratorio (BPL). Una vez se superen estos aspectos y se demuestre el potencial oncolítico se puede pasar a la evaluación en ensayos clínicos, en donde se deben realizar estudios de farmacocinética, farmacodinamia y actividad biológica y de bioseguridad (70, 71).

2.2 Rotavirus

2.2.1 Aspectos generales

El *Rotavirus* es el agente etiológico causante de la gastroenteritis en neonatos e infantes. Causa entre 600.000 a 870.000 muertes alrededor de todo el mundo y afecta especialmente a las ciudades que están en vías de desarrollo donde los pacientes no reciben una adecuada atención médica. La infección ocurre principalmente en el enterocito apical del intestino medio donde ocurre la adsorción. La pérdida de estas células es lo que causa la deshidratación y malnutrición lo que conlleva a la muerte (26).

El Rotavirus (RV) es un miembro de la familia *Reoviridae*, la cual consiste en 15 géneros. Basados en las propiedades antigénicas y la variabilidad genética de la proteína estructural VP6, el Rotavirus ha sido dividido en 8 grupos diferentes (RVA-hasta RVH) (31). Los RV A, B y C infectan humanos y varios animales, mientras que los RV E-H infectan animales. Epidemiológicamente el RVA es el más importante en humanos. Estos RVs y han sido clasificados de acuerdo con la secuencia de nucleótidos de VP7 y VP4, al patrón de migración del genoma y a patrones de hibridación ARN. La secuencia de nucleótidos de VP7 ha permitido la clasificación en 27 serotipos G y la secuencia de nucleótidos de VP4 en 37 tipos P. Por otro lado, el patrón de migración de los segmentos del genoma cuando son sujetos a geles de poliacrilamida permite la clasificación en largo, corto súper-corto y electroforesis atípicas (72).

2.2.2 Morfología y estructura

Los miembros de esta familia son virus ARN no envueltos, con cápside icosaédrica y triple capa de proteínas. Presenta un diámetro de 100 nm (26). La partícula infecciosa está compuesta de tres proteínas que se ha sido denominada partícula de la triple capa (TLP). Por análisis basados en criomicroscopía se ha determinado una estructura con simetría icosaédrica construida por 3 capas de proteínas. Una capa central o *core* constituida por 120 moléculas de la proteína VP2 arreglados en 60 dímeros. Cinco de los dímeros forman un decámero alrededor de un axis con simetría de cinco lados y 12 decámeros forman la capa de proteínas centrales con poros a los lados. Dentro de esta capa se encuentran las

proteínas VP1 y VP3 necesarias para la transcripción y replicación y los 11 segmentos de ARN de doble cadena del virus. Alrededor de la capa central (*core*), se encuentra la capa media, la cual está formada por 260 trímeros de la proteína VP6, lo cual constituye las partículas de doble capa (DLP). 260 trímeros de la proteína VP7 forman la tercera capa. Unida esta se encuentran 60 trímeros de las proteínas VP4. El virus con sus tres capas concéntricas forman la partícula de la triple capa (TLP) (31). (Fig. 1)

2.2.3 Genoma

El genoma del Rotavirus mide aproximadamente 18.500pb y consiste de 10 a 12 segmentos de ARN de doble cadena. Estos segmentos codifican para 6 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y 5 proteínas no estructurales (NSP1 a NSP5) (31, 73). Tabla 1. Sin embargo, en algunas especies del grupo A un segundo fragmento de lectura es detectado en el segmento 11 del genoma conduciendo a la expresión de otra proteína estructural (NSP6), además de la NSP5 (72). La longitud de los segmentos génicos se encuentra entre 667 y 3302pb (31). Debido a la naturaleza segmentada del genoma cuando ocurre co-infección con dos especies o más se puede dar un evento denominado “*reassortment*” o redistribución tanto *in vitro* como *in vivo* (72).

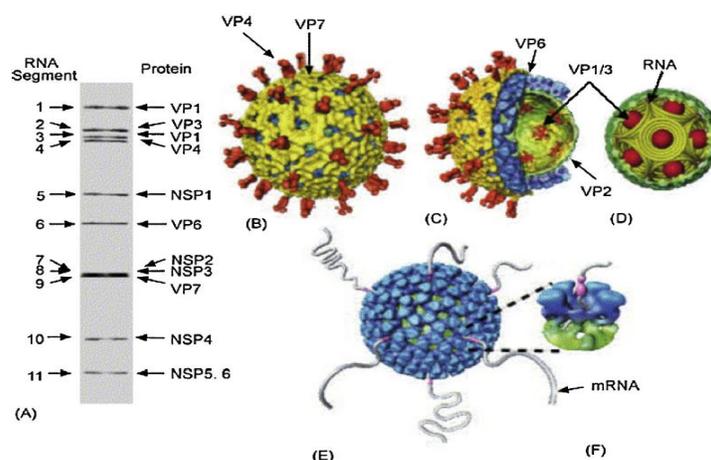


Fig. 1 Estructura del Rotavirus. En la figura se muestra una electroforesis con los 11 segmentos que hacen parte del genoma y las proteínas que codifican. A la derecha se muestra la estructura de cada capa del virus y las proteínas que las constituyen. Tomado de Desselberger, Ulrich. «Rotaviruses». *Virus research* 190 (2014): 75-96.

Tabla 1 Características del genoma de Rotavirus, localización y funciones de proteínas codificadas, adaptado de la especie RF de Rotavirus (G6P6(1)).

Tomado de Desselberger, U. (2014). *Rotaviruses*. *Virus Research*, 190, 75-96

| Segmento del genoma | Tamaño (pb) | Proteína codificada | Tamaño (Kda) | Localización en el virión | Funciones |
|---------------------|-------------|---------------------|--------------|---------------------------|---|
| 1 | 3302 | VP1 | 125 | Capa central | ARN polimerasa dependiente de ARN viral, unión a ARN de cadena sencilla (RdRp), complejo con VP3 |
| 2 | 2687 | VP2 | 94 | Capa central | Capa central, unión a ARN, requerida para la actividad RdRp, |
| 3 | 2592 | Vp3 | 88 | Capa central | Guanilidiltransferasa, metiltransferasa, 2'5'fosfodiesterasa, unión a ARN cadena sencilla, complejo con VP1 |
| 4 | 2362 | VP4 ^a | 86 | Capa externa | Homotrímero, antígeno de neutralización tipo P, proteína de adhesión, proteasa aumenta infectividad, virulencia y fusión con membrana celular. |
| 5 | 1581 | NSP1 | 58 | No estructural | Antagonista de interferon, Ligasa E3, Unión a ARN. |
| 6 | 1356 | VP6 | 44 | Capa media | Homotrímero, determinante de especie, protección (neutralización intracelular) requerida para transcripción. |
| 7 | 1062 | VP7 | 37 | Capa externa | Homotrímero, glicoproteína, , antígeno de neutralización tipo G, dependiente de Ca ²⁺ |
| 8 | 1059 | NSP2 | 36 | No estructural | Octámero, NTPasa de unión a ARN, cinasa NDP, desestabilizante de hélice, esencial para formación de viroplasma. |
| 9 | 1074 | NSP3 | 34 | No estructural | Dímero, se une a extremo 3' de ARN viral de cadena sencilla positiva, a eIFG4 celular, HSP90, desplaza PABP, inhibe la traducción de proteínas del huésped. |
| 10 | 751 | NSP4 | 20 | No estructural | Glicoproteína transmembranal que se ubica en el retículo endoplasmático rugoso de la célula huésped, viroporina, receptor intracelular de las DLPs, interactúa con viroplasma y vía autofagia, modula el ca ²⁺ intracelular, y replicación de ARN, enterotoxina (secretada), virulencia. |
| 11 | 666 | NSP5 | 21 | No estructural | Dímero, proteína fosfo y O-glicosilada, unión a ARN, cinasa esencial para la formación del viroplasma, interactúa con VP2 |
| | | NSP6 | 12 | No estructural | Interactúa con NSP5, localizada en viroplasma. |

a Rompimiento por tripsina o proteasa en VP5* + VP8*

2.2.4 Ciclo de replicación del *Rotavirus*.

El Rotavirus infecta enterocitos de las vellosidades intestinales y se replica exclusivamente en el citoplasma. Los viriones de los rotavirus ensamblados nuevamente no son completamente infecciosos, para penetración en la membrana la proteína VP4, debe ser proteolíticamente rota en los aminoácidos Arg231, Arg241 y Arg247 por proteasas similares a tripsinas dentro del tracto gastrointestinal. Esta cascada de proteólisis culmina en la escisión de la Arginina 247 generando dos segmentos: VP8 (28KDa, aminoácidos 1- 247 de VP4) y VP5 (60KDa, 248- 776 de VP4). Estos productos permanecen unidos de forma No-covalente en la superficie del virión maduro. La porción VP5 es trimérica en la base, en donde se ubica en medio de las capas de proteínas VP6 y VP7 y dos subunidades de la porción VP5 se extiende hacia afuera del virión. La proteína VP8 en forma dimérica se ubica en la parte distal de las dos subunidades de VP5 y se cree que la tercera subunidad de VP8 se disocia del virión. La proteína VP8 media la unión de muchas especies de Rotavirus (28), mientras que la subunidad VP5 media la penetración por interacción con integrinas.

La replicación del Rotavirus incluye los siguientes pasos (Fig. 2): (31)

1. Adhesión: mediado por las proteínas VP4 (VP8 y VP5), VP6 y VP7
2. Penetración y desunión.
3. Síntesis de ARN de cadena sencilla positiva mediada por V1 VP3 y VP2.
4. Formación del viroplasma, empaquetamiento de ARN, síntesis de ARN cadena negativa y formación de DLP.
5. maduración de la partícula viral (TLPs) y liberación.

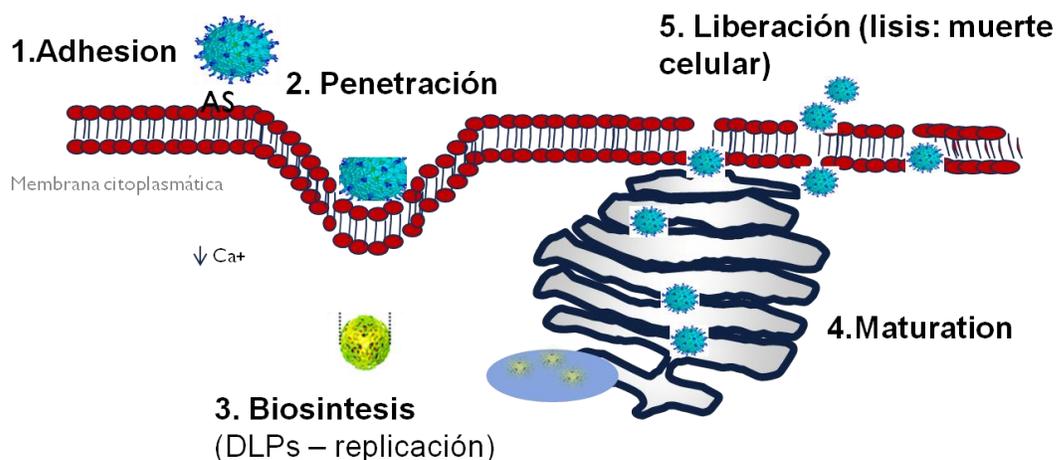


Fig. 2 Ciclo de replicación del rotavirus. Los rotavirus se unen a la célula blanco mediante varios receptores ubicados en la superficie de la membrana ya identificados. Penetra mediante el uso de

correceptores vía endosoma dependiente o independiente de clatrina y caveolina. La proteína estructural VP7 es liberada debido a las bajas concentraciones de Ca^{+2} . Las partículas virales DLPs inician la replicación de RNA y ensamblaje de DLPs en estructuras denominadas viroplasmos. Las DLPs son dirigidas hacia el RE a través de la proteína NSP4 del virus que se ubica en el RE y actúa como receptora. En el RE termina el ensamblaje del virus hasta la formación de partículas de triple capa (TLPs) que luego son liberadas en células MA104 mediante lisis. *Tomado y modificado de Trask S y cols 2012 (28).*

1. Adhesión.

Este es uno de los pasos importantes durante el ciclo de replicación del rotavirus y el que determina la especificidad y tropismo a la célula huésped. En este paso se presentan interacciones de proteínas de rotavirus con receptores específicos de la membrana celular. En la tabla 2 se muestra un resumen de las proteínas de superficie de la célula y las interacciones con proteínas virales.

La partícula infecciosa del Rotavirus, las TLP, interactúan por la proteína VP4 con receptores celulares (31). El producto de rompimiento de la proteína VP4, la VP8 media la unión, esta proteína tienen un dominio de plegamiento similar a galectina, para muchas especies y puede unirse a motivos que contengan ácido siálico (28). El paso de adhesión inicial es realizado in vitro en menos de un minuto (30) y es mediado por el reconocimiento específico de un glicano celular, el cual es uno de los determinantes de la especificidad de huésped (74). De acuerdo a esto los Rotavirus fueron clasificados inicialmente como Neuraminidasa (NA) resistente y Neuraminidasa sensible dependiendo de la susceptibilidad a la infección cuando las células fueron tratadas previamente con NA (75). Sin embargo, no todas las especies de Rotavirus requieren ácido siálico en el extremo terminal para la unión a la célula (28). Muchas especies de Rotavirus animales, incluyendo el Rotavirus Rhesus (RRV) se unen a receptores que contienen ácido siálico terminal tales como el gangliósido GM3. Algunos Rotavirus humanos que incluyen la especie Wa se unen a receptores con ácido siálico ubicado de forma lateral como el gangliósido GM1 (76). Otras especies de Rotavirus se unen a receptores sin ácido siálico como los antígenos de histogrupos sanguíneos tipo A, lo que podría determinar el tropismo dependiente de la edad en niños (76).

El dominio similar a galectina que se encuentra en la proteína VP8 determina la especificidad de unión a ácido siálico en algunas especies de rotavirus. En otras especies, en las cuales la especificidad no es determinada por el ácido siálico es debido a la inserción de asparagina en la posición 187 en VP8, en el bolsillo de unión a ácido siálico, el cual reorienta la tirosina 188, de tal forma que la cadena bloquea la

unión a ácido siálico mediante impedimento estérico, y permite que la tirosina reorientada pueda formar contactos hidrofóbico con los antígenos de grupos sanguíneo A (77).

Tabla 2 Receptores celulares y proteínas de unión que participan en la adhesión y unión

| Molécula en la célula | Proteína del Rotavirus | Actividad | Motivo de la proteína viral implicada | Referencias |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------|--|---|
| Ácido siálico | VP8* | Unión | Carbohydrate binding site | Dormitzer PR, y cols 2002 (78, 79) |
| $\alpha 2\beta 1$ | VP5* | Post-unión | DGE (VP5*) | Zarate S., y cols 2000 (80) |
| $\alpha 4\beta 1$ | VP7, VP5* | Post-unión | YGL (VP5*); LDV o LDI (VP7) | Coulson BS y cols 1997, Graham KL 2005 (81, 82) |
| $\alpha x\beta 2$ | VP7 | Post-unión | GPR (VP7) | Coulson BS y cols 1997, Hewish MJ 2000, (81, 83) |
| $\alpha v\beta 3$ | VP7 | Post-unión, Oxido-reducción | 161NEWLCNPMD169 | Guerrero Ca y cols 2000, (35) Graham KL 2003 (84) |
| Hsc70 | VP5*, VP7, VP6 | Chaperona | aa 642-658 (VP5*); aa 280-296 (VP6); aa 531-554 (VP5*) | Zarate S., 2003, Gualtero DF., 2007 (33, 85) |
| PDI | VP5*, VP7, VP6 | Chaperona, oxido-reducción | aa 189–210 and aa 243–263 (VP7) | Calderon MN, Guerrero CA y cols 2012, Calderon MN Guzmán F., y cols 2012 (86, 87) |
| HBGAs | VP8* | Unión | Sitio de unión a carbohidrato | Liu Y y cols 2012, Hu L y cols (76, 77, 88) |
| JAM-A | VP4 | Post-unión | | Torres-Flores y cols 2015 (89) |

Después de la unión inicial varias proteínas pueden actuar como correceptoras del rotavirus, entre ellas varias proteínas heterodiméricas integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, las cuales interactúan con motivos ligandos en VP5 o VP7. (motivo DGE en VP5 o RGD en VP7) o con las proteínas de choque térmico HSC70, todos los correceptores se encuentran en balsas lipídicas (sitios de la membrana con lípidos resistentes a detergentes) que actúan como plataformas de asociación de las TLPs (31). Sin embargo, no todas las especies requieren integrinas, mientras que todas las especies si han mostrado requerir HSC70 (75). Los residuos de VP5 son implicados en la penetración y en la unión a integrinas la extremo carboxiterminal de VP5. La subunidad VP5 contiene dominios DGE e IDA que interactúan con la integrina $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ respectivamente. VP7 tiene el sitio de unión a la integrina $\alpha x\beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$. La integrina $\alpha 2\beta 1$ sirve de unión para especies de rotavirus resistentes a neuraminidasa (nar3) a través de

la unión con el dominio DGE de VP5 (80). Mientras que la integrina $\alpha\beta3$ ha mostrado servir como un receptor común para especies neuraminidasa resistentes como neuraminidasa sensibles (35, 90).

La interacción viral con HSc70 también es un paso pos-adhesión y es dado por un dominio de VP5 localizado entre los aminoácidos 642 a 658 (85). El segmento de HSc70 de unión a rotavirus se ubica en el extremo carboxi-terminal en el dominio de unión a péptido (aminoácidos 384-650). La interacción de rotavirus con este dominio reduce la infectividad de manera dependiente de ATP. Adicionalmente, es sugerido que Hsc 70 no solo actúa como un receptor del rotavirus en la membrana de las células y sirve de anclaje durante el paso del rotavirus hacia el espacio citoplasmático, sino que también ayuda al virus a entrar a la célula posiblemente por inducción de cambios conformacionales de las proteínas de superficie del rotavirus (91).

2. Penetración y desunión

Después del contacto con el receptor, la proteína VP4 de TLPs experimenta cambios conformacionales de tal forma que el dominio lipofílico de VP5 que se encuentra debajo de VP8 es expuesto en la superficie en forma de un estado similar a sombrilla. Seguido de la unión, el mecanismo de entrada del rotavirus puede darse por vía endocítica o No. Durante este proceso de entrada las proteínas de la cápsida externa (VP7) se solubilizan debido a bajas concentraciones de calcio en los endosomas, adicionalmente durante la entrada se requiere la presencia de colesterol y de la GTPasa dinamina en la membrana celular (31). Las especies de rotavirus difieren en el mecanismo de entrada, se ha reportado que la entrada de la especie de rotavirus RRV en células MA104 es independiente de endocitosis mediada por caveolina y clatrina y es independiente de dinamina (una proteína involucrada en la escisión de las vesículas endocíticas desde la membrana celular) (92). Al contrario, las especies bovina UK, porcina TRF41 y humana Wa utilizan la vía endocítica mediada por clatrina (93). Se cree que la proteína VP5 permeabiliza la membrana celular para la formación de poro y la consecuente liberación de DLPs dentro del espacio citoplasmático (78, 79). La proteína VP7 probablemente estabiliza la proteína VP5 en la parte superior para permitir una adecuada penetración. Durante este proceso las TLPs son internalizadas y las bajas concentraciones de calcio en el endosoma desestabilizan el trímero de VP7 liberándolas del virión, esta disociación permite que se induzcan cambios conformacionales en la proteína VP5 para que induzca la formación de poros en la membrana del endosoma y se libere las DLP (partículas de doble capa) al citoplasma (28). Teniendo en cuenta estos hallazgos en la interacción entre rotavirus y proteínas de superficie celular, durante la unión y penetración Guerrero y cols 2015 han propuesto un modelo para la entrada del rotavirus a la célula (37). (Fig. 3)

3. Síntesis de ARN de cadena sencilla positiva

Las partículas de rotavirus poseen su propio complejo de transcripción, consiste en las proteínas VP1, la cual es una polimerasa ARN dependiente de ARN (RdRp) y la proteína VP3 que es la enzima *capping* con actividad metilasa, guaniltransferasa, y fosfodiesterasa. Este complejo se encuentra en la superficie interna de la capa central compuesta por VP2 (31). La proteína VP1 es una enzima globular compuesta por un dominio central conservado con actividad polimerasa (42). Los ARN(+) de rotavirus sirven como ARNm para la síntesis de proteínas (replicación temprana) y como templetes para la replicación de ARNs (ciclo de replicación tardío) (94). Un incremento logarítmico en la producción de ARNm en los estadios tardíos de infección (>4 horas post-infección) indica que los DLPs nuevamente sintetizados tienen transcripción activa (31).

4. Formación del viroplasma, empaquetamiento de ARN, síntesis de ARN cadena negativa y formación de DLP.

Los productos de ARN+ que salen de las DLPs se acumulan en el citoplasma y son disponibles para la traducción por los ribosomas de la célula huésped. Las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 se co-localizan alrededor de los DLPS que están transcribiendo y forman la estructura denominada viroplasma (94). La proteína NSP2 se une a VP1, VP2 y a la tubulina, sugiriendo que la tubulina hace parte del viroplasma. Los proteasomas funcionales y proteínas de la autofagia son esenciales para la formación del viroplasma y la replicación viral (31). El empaquetamiento de los 11 segmentos de ARN+ es no claramente determinado, sin embargo, se han propuesto dos modelos para este paso. Un primer modelo denominado «empaquetamiento concertado» en donde la distribución de los 11 segmentos de ARN+ se da por interacciones ARN-ARN antes del empaquetamiento del genoma (94). Primero la proteína VP1 (o en complejo con VP3), se une a los extremos 3' de ARN(+), en una secuencia conservada de 4 nucleótidos (UGUG), creando 11 diferentes complejos ARN-enzima (28). Los 11 complejos se distribuyen en la ausencia de VP2 (94). El segundo modelo denominado «llenado del core» propone que los 11 segmentos de ARN (+) experimentan una ordenada inserción dentro del complejo de proteínas preformado a través de la actividad ATPasa de la proteína NSP2. De esta manera la selección de ARN es mediada no por las interacciones entre ARN, sino por la unión específica de los ARN (+) a proteínas virales. Seguido a este proceso de empaquetamiento la expansión del cápside central se inicia la síntesis de la hebra negativa para general el genoma ARN de cadena doble (94). Una vez formadas las partículas centrales, VP1, VP2 y VP3, estas son transcapsidadas por la proteína VP6 conduciendo a la síntesis de DLPs (31). La proteína NSP3 interactúa con el extremo 3' de los ARN virales de cadena sencilla y con el factor de traducción eIF4G (31), inhibiendo la síntesis de proteínas (95).

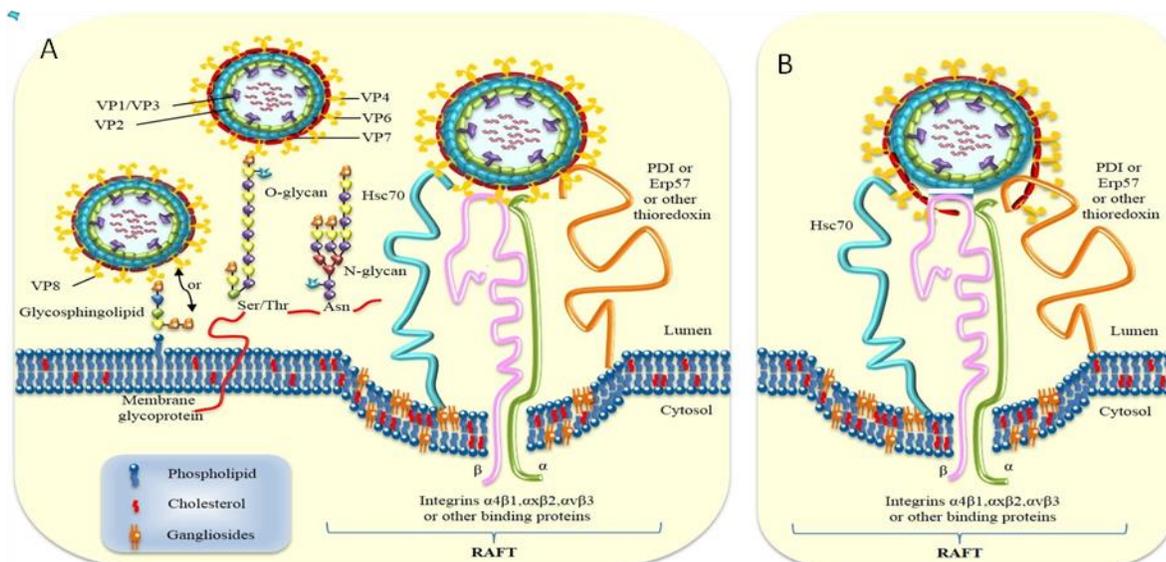


Fig. 3 Interacciones del Rotavirus–receptores superficie de la célula durante el proceso de entrada. A. La infección es iniciada por la interacción mediada por la proteína VP8 (adhesión) ácidos siálicos (AS) terminales o sub-terminales localizados en glucolípidos de la superficie celular incluyendo gangliósido o ácidos siálico-localizados en la superficie de glicoproteínas. N y O glicosilación derivados de ácido neuramínico son indicados. Rotavirus resistentes a neuraminidasa pueden unirse directamente a $\alpha 2\beta 1$ a través de la secuencia DGE en VP5. Especies dependientes de ácido siálico se unen primero a través de VP8 a AS antes de interactuar con la $\alpha 2\beta 1$ a través de VP5. Un probable receptor de la superficie celular asociado a microdominios lipídicos que contienen caveolina es representado. La secuencia de interacción virión-célula que toma lugar después de la unión a $\alpha 2\beta 1$ no ha sido establecida. Sin embargo varias interacciones que involucran proteínas estructurales (VP5, VP6 y VP7) y receptores de superficie celulares asociados a microdominios lipídicos (Hsc70, PDI e integrinas $\alpha 4\beta 1, \alpha \beta 2$ and $\alpha \nu \beta 3$) ha sido documentada. Estas interacciones son ilustradas. B. Disrupción de proteínas de rotavirus (VP5, VP6 y VP7), causada por chaperona (Hsc70 y PDI) y actividad oxido-reductasa (PDI, integrina $\alpha \nu \beta 3$) es representada. Tomado de Guerrero y cols 2016 (96).

5. Maduración de la partícula viral y liberación.

Para el completo ensamblaje del virión, las DLPS deben salir del viroplasma, asociarse con la proteína VP4 y luego alcanzar la membrana del retículo endoplasmático para adquirir la proteína VP7. Este paso es regulado por la proteína NSP4 (28). NSP4 recluta DLPs y VP4 desde la cara citosólica del RE, este complejo DLPs-VP4-NSP4 induce deformación de la membrana del RE translocando el complejo al RE. La membrana es removida y posteriormente la proteína VP7 es ensamblada y estabilizada con las altas concentraciones de Ca^{+2} existentes en el RE. Las TLPs son liberadas desde células no polarizadas MA104 por lisis celular y en células epiteliales como Caco2 se ha descrito un proceso de gemación que directamente no mata la célula (28, 31), así como también morfología compatible con apoptosis ha sido detectada en línea celular de adenocarcinoma de colon (HT-29) infectada con Rotavirus SA-11 (97).

2.2.5 Mecanismos de muerte relacionados con proteínas de rotavirus.

Hay pocos estudios que relacionan la infección con Rotavirus y los diferentes subtipos de muerte celular generados durante la liberación de las TLPs. Un estudio inicial realizado por Superti F, y cols 1996 en células de adenocarcinoma de colon (HT-29) infectadas con Rotavirus SA-11 reportan muerte celular relacionada con apoptosis debido a la observación de condensación y fragmentación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos (97). En otro estudio realizado en células CaCo2 de adenocarcinoma de colon infectadas con Rotavirus RRV se evidenció que durante el proceso infeccioso se conduce a pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación del citocromo *c* desde la mitocondria y que este evento es dependiente de la multiplicidad de infección y del tiempo post infección, generándose después de las 4 horas a 24 horas post infección (98). Por otro lado, la infección de células MA104 con Rotavirus RRV indujo activación de caspasa 3, fragmentación de ADN, rompimiento de la polimerasa poliADP ribosa, liberación de citocromo *c* desde la mitocondria y activación de la proteína pro-apoptótica Bax (un miembro de la familia Bcl-2), indicando una ruta de muerte relacionada con apoptosis (99).

Durante los estadios tempranos de infección, el rotavirus interactúa con la proteína PI3K para activar esta vía. La proteína NSP1 interactúa con las subunidades α y β de la subunidad reguladora p85 de PI3K, para promover vías de supervivencia celular e inhibir la apoptosis por medio de activación de la proteína AKT (100). Así mismo se ha mostrado que NSP1 interactúa con el dominio de unión a ADN de p53, este evento lo dirige a degradación vía proteasoma y suprime la muerte celular por apoptosis. Durante los estadios tardíos cuando se ha generado la progenie viral la interacción NSP1-p53 se disminuye lo que resulta en restauración del nivel de p53 e inicio de las señales pro-apoptóticas (101).

La proteína NSP4 ha mostrado estar implicada en el proceso de muerte celular modulado por el rotavirus. Bhowmick R, y cols 2012, reportaron que la proteína NSP4 tiene funciones pro-apoptóticas debido a que se localiza en la membrana mitocondrial junto con la proteína traslocadora de adenina y el canal de anión dependiente de voltaje, esto induce liberación del citocromo *c* desde la mitocondria y activación de caspasas durante estadios tardíos de la infección. Estas funciones de NSP4 son inhibidas durante las fases iniciales de la infección por la activación de la vía PI3K/AKT por NSP1 (102). También se ha mostrado que la proteína NSP4 de rotavirus bovino induce activación de caspasa 4 y la proteína homóloga C/EBP, la cual está relacionada con apoptosis inducida por estrés del RE (103). Adicionalmente, se ha reportado que la proteína NSP6 de diferentes especies de rotavirus podrían

afectar las funciones mitocondriales durante el proceso infeccioso ya que esta se localiza en la membrana mitocondrial a través de una secuencia conservada en el extremo N-terminal (104).

2.3 Cáncer de Ovario

El ovario normal está compuesto por un tejido complejo que tiene diferentes componentes. EL 90% de los tumores tienen una histología epitelial y se cree que se originan a partir de la superficie epitelial ovárica (ESO) (105, 106). El cáncer Epitelial ovárico (CEO) es un grupo heterogéneo de neoplasmas que presentan un amplio rango de heterogeneidad morfológica, manifestaciones clínicas y alteraciones genéticas (107) Lo que ha llevado a reevaluar el origen anatómico del CO por lo que en los últimos años han surgido diversas teorías donde se plantean orígenes diferentes al ESO, como por ejemplo la trompa de Falopio, depósitos de endometriosis, o la superficie de la cavidad peritoneal (105).

El ESO está compuesto por células epiteliales cuboidales, caracterizadas por la presencia de citoqueratinas 7, 8, 18 y 19, antígeno de mucina, 17 β -hidroxiesteroide y laminina. El contacto y la integridad epitelial del ESO son mantenidas por desmosomas, integrinas y cadherinas (108). Las cadherinas que son proteínas que mantienen la adhesión célula-célula influyen en la expresión de genes, por lo tanto, una desregulación en estas proteínas durante el proceso de carcinogénesis se ve reflejada directamente en la regulación genética. La N-cadherina es la proteína que mantiene las uniones intercelulares en las células de la granulosa y en el mesotelio extra-ovárico, la E-cadherina es la principal molécula de adhesión de las células epiteliales presentes en el endometrio y epitelio endocervical. En el ESO la expresión de E-Cadherina es limitada a regiones donde las células asumen estructuras columnares asimilando un fenotipo metáplásico (109), el resto de células del ESO carece de expresión de E-cadherina y CA 125, dos marcadores relacionados con características de epitelio maduro diferenciado. En lugar de estas proteínas expresa marcadores relacionados con características de tejido mesenquimal como N-cadherina y Vimentina (110). La co-expresión de E-cadherina y N-cadherina ha sido asociada a diferenciación epitelial aberrante y adquisición de características de malignidad (108) y la posterior pérdida de la E-cadherina de la célula epitelial ovárica promueve la metástasis (109).

Actualmente la clasificación del CO se realiza de acuerdo con las características morfológicas y quirúrgicas. La clasificación realizada por la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y obstetricia) involucra estadiaje de acuerdo a las características quirúrgicas, de la siguiente forma: (111)

- Estadios I, limitado al ovario o trompa de Falopio

- Estadio 2, involucra 1 o ambos ovarios, trompas de Falopio, con extensión pélvica o cáncer peritoneal primario.
- Estadio 3, involucra uno o ambos ovarios con confirmación citológica o histológica de diseminación al peritoneo, fuera de la pelvis y o metástasis de nódulos linfoides retroperitoneales
- Estadio 4, distintas metástasis diferentes a metástasis peritoneal.

Por otro lado, las características morfológicas han servido durante varias décadas para la fundamentación de la carcinogénesis del ovario y basados en un origen celular histológico la OMS (organización mundial de la salud) clasifica el CO de la siguiente forma: (112)

- Tumores de origen epitelial
- Tumores de los cordones sexuales-estroma (mesénquima sexualmente diferenciado)
- Tumores de células germinales.

El 90 % de los tumores que se desarrollan en el ovario son de origen epitelial y estos básicamente son subdivididos en 8 subtipos histológicos: seroso, endometrioide, mucinoso, célula clara, transicional, escamoso, célula mixta e indiferenciado (107, 113).

En el proceso de carcinogénesis convencional se han establecido varios criterios para el desarrollo y evolución del tumor, como por ejemplo el modelo de evolución clonal, en donde las células van adquiriendo ciertas capacidades durante la transformación maligna que le permiten adaptarse al microambiente y posteriormente hacer metástasis y que generalmente el tejido maligno guarda una estrecha relación entre las características histológicas y moleculares con el tejido de origen, esto no se ha podido determinar en el CO, lo cual puede ser atribuido a la clasificación empleada hasta ahora y el poco entendimiento que tenemos de esta patología (105).

La carcinogénesis del ovario muestra una gran heterogeneidad en cuanto a evolución del tumor y características celulares lo que ha llevado a plantear un modelo dual de clasificación basado en los hallazgos moleculares y morfológicos para tratar de explicar las vías de carcinogénesis implicadas en la evolución del tumor de ovario (114). Esto es debido a que en la carcinogénesis del CO no se ha observado la clásica vía de evolución de los procesos tumorales comprobados en otros cánceres (107).

2.4 Integrinas

Las integrinas se encuentran entre las proteínas receptores de superficie de membrana citoplasmáticas más abundantes y son expresadas en todos los tipos celulares a excepción de los eritrocitos (115). Son receptores heterodiméricos α/β que regulan interacciones entre células y la matriz extracelular. A la fecha se han mapeado en el genoma humano 18 sub-unidades α y 8 sub-unidades β , las cuales forman al menos 24 heterodímeros funcionales con diferente especificidad y afinidad en cuanto a ligando (116). Cada subunidad de la integrina tiene un dominio extracelular, una región transmembranal y una corta región citoplasmática (30-40 aminoácidos) (117). En general cada heterodímero de integrina se puede unir a múltiples ligandos y cada ligando puede unirse a múltiples heterodímeros de integrinas, indicando que el patrón de expresión espacio-temporal de ellas determinan como una célula censa y responde a los diferentes estímulos (116). Mientras que cada heterodímero α/β muestra diferentes patrones de expresión en las células normales, en las células tumorales su expresión es alterada. Esta alteración del patrón de expresión tiene un papel importante durante la transformación maligna en proliferación, supervivencia, invasión y metástasis de la célula tumoral (5).

2.4.1 Integrinas y cáncer de ovario.

En el CO a diseminación de la célula tumoral y la proliferación local depende de la colonización de las células mediante procesos de adhesión celular dentro del linaje mesotelial de la cavidad peritoneal y subsecuente invasión a los órganos circundantes. Las integrinas son fuertemente implicadas en estos eventos. De los reportes pioneros en involucrar las integrinas y la transformación maligna del epitelio ovárico se encuentra el realizado por Skubitz Amy P.N. y cols en 1996, quienes reportaron disminución en la expresión de las integrinas $\alpha6\beta4$ en células epiteliales de tumor sólido de ovario y de ascitis comparadas con epitelio normal, sugiriendo un papel para estas integrinas durante el proceso de invasión (118). Lau MT y cols 2012, determinaron que la integrina $\beta1$ mediante interacción con el factor de crecimiento epidérmico induce la invasión en el tumor de ovario. La formación de agregados celulares característicos del ascitis en el tumor de ovario ha sido relacionada con la sobreexpresión de la integrina $\alpha3$ y aumento de la actividad catalítica de la metaloproteinasa MT1 (119).

La integrina $\alpha v\beta3$ fue la primera integrina de las subunidades αv en estar relacionadas con la angiogénesis. Estas integrinas son ampliamente expresadas en vasos sanguíneos de biopsias de tumores humanos pero no en vasos de tejidos normales (117). En cáncer de ovario la sobreexpresión de estas integrinas ha sido correlacionada con mayor resistencia a quimioterapia y pobre pronóstico (120, 121). Se ha relacionado que el aumento en la interacción entre la integrina $\alpha v\beta3$ -vitronectina de la

matriz extracelular aumenta la motilidad y proliferación de la célula epitelial tumoral ovárica (122). Por el contrario Partheen K., y cols 2008 encuentran que la disminución en la expresión de la integrina $\alpha\beta3$ esta correlacionada con un mejor pronostico (123). El bloqueo de la $\alpha\beta3$ mediante antagonistas induce apoptosis de la célula endotelial, aumento de la actividad de la proteína supresora de tumor p53, aumento en los niveles de proteína del inhibidor p21waf1 y disminución de la proteína antiapoptótica BAX (117). Así mismo el tratamiento de células tumorales de ovario con antagonistas de la integrina $\alpha\beta3$ disminuye la proliferación y la invasión (124), como también la inhibición de la integrina $\beta3$ se relaciona con disminución de la proliferación y la apoptosis (125). El aumento gradual de la integrina $\alpha\beta6$ también ha sido correlacionado con la progresión del cáncer de ovario epitelial (126). Estos resultados muestran que las integrinas son sobre-expresadas en la célula epitelial durante la transformación maligna y pueden ser usadas como blancos moleculares para el diseño de VO que interactúen con ella durante el proceso de entrada.

3 CAPÍTULO 2. MARCO CONTEXTUAL

3.1 Antecedentes

La viroterapia tiene como principal ventaja la selectividad del virus por las células tumorales sin infectar las células no tumorales (48). Algunos de los virus usados en pruebas preclínicas y clínicas son oncotrópicos por naturaleza y otros han sido modificados para inducir la infección en la célula tumoral (56). Teniendo como objetivo el diseño de un agente viral oncolítico basado en cepas de rotavirus, en el laboratorio de biología molecular del virus de la Universidad Nacional facultad de Medicina, se ha venido estudiando el potencial oncolítico de cinco agentes rotavirales generados mediante coinfección de cepas rotavirus tipo silvestre adaptadas para infectar y replicarse en células tumorales. La adaptación involucró la infección de líneas celulares tumorales previamente expuestas a 42°C por 30 minutos (para inducir la expresión de proteínas de choque térmico) con varios tipos de virus silvestre. Esto permitió seleccionar aislamientos rotavirales con capacidad de infectar células con sobreexpresión de proteínas Hsp's. El aislamiento rotaviral TRUYO fue generado por el uso de las siguientes cinco cepas silvestres: TRF-41 (G5) (cerdo), RRV (G3-P3) (mono Rhesus), UK (G6-P5) (bovino), Ym (G11-P9) (porcino) y OSU (porcino). La mezcla se realizó mediante 100 ciclos de replicación que permitieron una selección evolutiva. Se ha postulado que este virus podría tener un papel oncolítico debido a que induce la expresión de marcadores relacionados con muerte celular (37, 38, 40). En una etapa posterior teniendo en cuenta las recomendaciones del comité "*The international conference on harmonisation of technical requirement for registration of pharmaceuticals for human use*", (ICH), como primer paso para el diseño y caracterización de los aislamientos rotavirales como agentes virales oncolíticos, en el LBVUNAL se han realizado estudios *in vitro* en diversas líneas celulares tumorales, entre ellas: la línea celular de leucemia mieloide humana U937, leucemia linfocítica aguda Reh, cáncer de estómago KATO III, cáncer de Pulmón A549, cáncer de mama MCF-7, mieloide de ratón Sp2/0-Ag14 y cultivos primarios de leucemias humanas y No tumorales como la línea celular de fibroblastos L929, en donde se ha demostrado que al bloquear con anticuerpos específicos las diferentes proteínas HSP, PDI y e integrina $\alpha\beta 3$ se induce una disminución de la infección por parte de todos los aislamiento rotavirales. Lo que llevo a sugerir que estos aislados rotavirales pueden ser usados como virus oncolíticos en tumores que expresen las proteínas de choque térmico (37-41).

3.2 Formulación del problema

El CO es la séptima causa de muerte en mujeres. Para el año 2018 se diagnosticaron 295.414 casos y 184.799 muertes relacionadas con esta enfermedad a nivel mundial (C56) (1). Los factores pronósticos tales como estado quirúrgico, volumen residual del tumor postquirúrgico, grado histológico y marcadores tumorales son insuficientes para hacer un tratamiento específico en pacientes con CO (127). La supervivencia a cinco años de las pacientes con diagnóstico de CO es solo del 30% aproximadamente, debido a que el diagnóstico se realiza en estadios III y IV y la alta resistencia presentada por las pacientes a los tratamientos actuales basados en platinos (>75%)(28, 123, 128, 129). Adicionalmente, se ha descrito que el 40% de las pacientes que responden inicialmente a la quimioterapia presentan recurrencia (130). Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas alternativas terapéuticas que puedan ser usadas como monoterapia o terapia adyuvante que permitan mejorar la sobrevida en estos pacientes.

Una de las alternativas para tratamiento del cáncer ha sido el uso de virus oncolíticos (131-133). En el laboratorio de biología molecular del virus de la Universidad Nacional de Colombia (LBVUNAL) se ha venido trabajando con rotavirus generados por selección evolutiva, para los cuales se ha mostrado que tienen la capacidad de infectar diversas líneas celulares como U937, cáncer de estómago KATO III, cáncer de Pulmón A549, cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, cáncer de próstata PC-3, mieloma de ratón Sp2/0-Ag14, y que para el proceso infeccioso son importantes las proteínas de choque térmico Hsc70, PDI y la integrina $\alpha\beta3$. Estos rotavirus no han sido evaluados en líneas celulares de cáncer de ovario, ni en cultivos primarios obtenidos de pacientes de cáncer de ovario. Tampoco se ha evaluado si las células de tumor de ovario expresan en la membrana celular las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60 o Hsp40, PDI y las integrinas $\beta1$, $\beta2$ y /o $\beta3$. Ni tampoco si la probable capacidad infectiva y oncolítica del aislamiento rotaviral TRUYO se relaciona con la presencia de estas proteínas en la membrana citoplasmática de células tumorales de ovario.

3.3 Justificación

Durante el proceso de transformación maligna la célula cancerígena de ovario aumenta la expresión de una serie de proteínas entre las cuales se encuentran integrinas, proteínas de choque térmico y la proteína PDI. Las integrinas que se han correlacionado ya sea con un pobre pronóstico o con la capacidad de las células tumorales de formar esferoides y adquirir la capacidad de hacer metástasis son: la integrina $\alpha6\beta4$ (118), integrina $\beta1$ (134), la integrina $\alpha3$ (119), integrina $\alpha\beta3$ (120-122), integrina

$\alpha v\beta 6$ (126). Así como de también se ha descrito la relación entre proteínas de choque térmico y la transformación maligna del ovario. Entre estas se ha relacionado la expresión de la proteína HSP27 con desarrollo de tumor de ovario de alto grado y la capacidad de la célula tumoral de hacer metástasis (135, 136), aumento en el ARN mensajero de HSP60 con mayor supervivencia (137) y por el contrario aumento de expresión en la proteína Hsc70 con peor pronóstico (138), esto hace atractivas a estas proteínas para ser usados como blancos terapéuticos. Un ejemplo es el diseño de virus oncolíticos que usen estas proteínas como receptores para unión y entrada a la célula. Uno de los parámetros limitante en la viroterapia oncolítica actual es la presencia de receptores limitados para la entrada de los virus. Dado que las células tumorales expresan las proteínas que han sido relacionadas como receptores de membrana del rotavirus, es probable que los aislados rotavirales generados en el laboratorio de biología molecular de virus infecten e induzcan la muerte de estas células tumorales.

Por otro lado, para el diseño y uso de agentes virales oncolíticos el ICH ha sugerido una serie de pasos necesarios para evaluar el potencial oncolítico de los virus. En el primer paso, se deben realizar ensayos *in vitro* para evaluar la toxicidad del agente viral en líneas celulares permisivas y no permisivas (71). En el laboratorio de biología molecular de virus se ha evaluado el potencial oncolítico en diversas líneas celulares (37, 38, 40). Sin embargo, no se había evaluado en línea celular de ovario, ni en cultivos primarios de CO. Estos últimos podrían representar de una forma más cercana la arquitectura tisular del tumor. Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario evaluar si el aislamiento rotaviral *TRUYO* infecta líneas celulares de origen ovárico y células tumorales en cultivo primario obtenidos de pacientes con cáncer de ovario. Una vez se determine la capacidad infecciosa de este virus, es necesario conocer si las proteínas involucradas en el proceso infeccioso en otros tipos de líneas celulares también participan durante la entrada del rotavirus *TRUYO* en este tipo de células tumorales y adicionalmente, es importante determinar si la infección induce muerte celular y los posibles mecanismos de muerte. La evaluación del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral *TRUYO in vitro* en cultivos primarios, permitirá plantear el segundo paso de las recomendaciones del ICH, el cual implica evaluación de la seguridad del agente viral oncolítico en modelo animal.

A partir de conocimiento previo de los rotavirus adaptados y de la biología del cáncer de ovario se formularon las siguientes preguntas:

1. ¿Células provenientes de línea celular de ovario y las obtenidas en cultivos primarios a partir de tejidos tumorales de pacientes con cáncer de ovario expresan las proteínas de choque térmico, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, la proteína PDI y las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$?

2. ¿Las células de tumor de ovarios son susceptibles permisivas a la infección del rotavirus TRUYO?
3. ¿Qué papel juegan las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, la proteína PDI y las integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ durante los primeros eventos de infección del rotavirus TRUYO?
4. ¿La infección por rotavirus TRUYO genera efectos citotóxicos y cambios en la expresión de proteínas relacionadas con muerte celular?

3.4 Hipótesis de trabajo

Las células de cáncer de ovario que expresen las proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70), PDI y/o la integrina $\beta 3$ en su membrana citoplasmática son susceptibles y permisivas a la infección por el rotavirus TRUYO generando muerte celular.

Para resolver las preguntas de investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

3.5 Objetivos

3.5.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad infectiva y oncolítica del rotavirus TRUYO en células tumorales de pacientes con cáncer de ovario.

3.5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad infectiva del rotavirus TRUYO en un modelo in vitro de células de pacientes con cáncer de ovario.
2. Establecer la participación de las proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70), PDI y la integrina $\alpha V\beta 3$ de la membrana citoplasmática de células tumorales de ovario durante el paso de penetración rotavirus TRUYO.
3. Identificar la expresión de marcadores moleculares de muerte celular en cultivos primarios obtenidos de pacientes con cáncer de ovario infectadas con el aislamiento rotaviral TRUYO

Para alcanzar estos objetivos, esta tesis fue dividida en 2 capítulos, los cuales permitieron responder de forma integrada las preguntas planteadas y representan los manuscritos sometidos.

4. CAPÍTULO 3. RESULTADOS LÍNEA CÉLULAR

4.1 CARACTERIZACIÓN DE ROTAVIRUS ADAPTADO (TRUYO).

4.1.1 Determinación del genotipo análisis de secuencia de rotavirus y TRUYO.

RNA fue obtenido a partir de TLPs purificadas por CsCl. Las secuencias obtenidas por secuenciación Illumina de genoma completo Hiseq 2500 (Macrogen, Korea) fueron analizadas usando la base de datos virusTAP para obtener las secuencias “contigs” (Anexo 1 A). Posteriormente se realizaron alineamientos múltiples de los “contigs” obtenidos para rotavirus frente a las secuencias reportadas en NCBI para las especies de rotavirus TRF, RRV, UK, YM y OSU usando la herramienta bioinformática “Multalin” (Anexo 1 B). La determinación del genotipo (VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5) fue determinada usando la herramienta automatizada de genotipificación RotaC v2.0 y teniendo en cuenta el porcentaje de identidad de cada segmento (Anexo 2). Esta base de datos usa alineamiento múltiple clustal 2,1, usando la matriz de distancia por pares con el algoritmo Needleman-Wunsch y permite la construcción de árboles filogenéticos usando el algoritmo del vecino más cercano (139) La genotipificación se realizó de acuerdo con las guías propuestas por el grupo de trabajo para la clasificación de RV (Rotavirus Classification Working Group (RCWG): Gx-P(x)-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, donde X define el genotipo de cada uno de los genes

4.1.1 Resultados de la caracterización molecular del rotavirus

Teniendo en cuenta que el rotavirus TUYO es un virus generado por adaptación de 5 especies de rotavirus que infectan animales: TRF (cerdo), RRV (mono Rhesus), UK (bovino), YM (cerdo) y OSU (porcino), adaptación en tumorales humanas, la secuencia del rotavirus purificado por cloruro de cesio fue secuenciado usando Illumina TruSeq con cubrimiento de 35x con el objetivo de identificar la especie obtenida. La secuencia obtenida fue ensamblada usando la herramienta virusTAP. Se detectó que las secuencias alinean con rotavirus del grupo A. De acuerdo con las secuencias (contigs) obtenidas en la base de datos VirusTAP, se logró identificar el genotipo de acuerdo con las secuencias de los genes: VP6 (I), VP1(R), VP2 (C), VP3 (M), NSP1(A), NSP2(N) y NSP3(T). El genotipo encontrado fue I2-R2-C3-M2-A3-N2-T7(6)- y Ix-Rx-C2-M2-A9-Nx-T3 (Anexo 3). El análisis filogenético muestra una relación más cercana con rotavirus bovino y simio. Indicando que la especie que predominó durante la distribución fueron estas dos especies (Anexo 4) y en el electroferotipo se muestran los 11 segmentos correspondientes al genoma de rotavirus. (Anexo5)

4.2 ACTIVIDAD ONCOLITICA DEL ROTAVIRUS TRUYO EN LA LINEA CELULAR MES-OV

4.2.1 Contextualización

Una de las terapias prometedoras para el tratamiento del cáncer, que ha tenido gran desarrollo en las últimas décadas, es la terapia viral oncolítica (TVO). Un virus oncolítico (VO) preferencialmente se dirige a las células tumorales, las infecta, se replica e induce muerte de estas sin tener efectos tóxicos en las células no tumorales (140). Este tropismo del VO por la célula tumoral es atribuido a la sobreexpresión de moléculas receptoras en la superficie y a la alteración en moléculas de vías de señalización celular en las células tumorales. Esto le permite al VO adherirse, entrar y replicarse de manera más efectiva que en una célula no tumoral (42). El mecanismo por el cual la TVO ha mostrado tener efectividad es dada por oncolisis directa causada por el VO en células infectadas, al mismo tiempo que induce cambios en el microambiente inmune tumoral (141). Las pruebas clínicas con VO como monoterapia han mostrado evidencia de respuesta antitumoral (20). Muchos de los VO que se encuentran actualmente en ensayos clínicos o preclínicos tienen un tropismo natural para proteínas de superficie que son sobre expresadas en la célula tumoral o son modificados para que se unan directamente a un único receptor de la superficie celular (14). Sin embargo, el uso de receptores específicos limita el número de tumores candidatos para tratamiento por cada VO. Una alternativa es el diseño o selección de VO que usen diversas proteínas receptoras de la membrana de las células tumorales.

El Rotavirus (RVs) es el agente etiológico causante de la gastroenteritis en neonatos e infantes. La infección ocurre principalmente en el enterocito apical del intestino medio (26). Basados en las propiedades antigénicas y la variabilidad genética de la proteína estructural VP6, el RV ha sido dividido en 8 grupos diferentes (RVA-hasta RV H) (31). Los RV A, B y C infectan humanos y varios animales, mientras que los RV E, F, G y H infectan animales (72). Este virus es RNA, no envuelto, con cápside icosaédrica y de triple capa de proteínas con un diámetro 70-80 nm (26). Su genoma mide aproximadamente 18.500 pb y consiste en 11 segmentos de RNA de doble cadena, los cuales codifican para 6 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4 VP6 y VP7) y 6 proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6) (31, 73). La partícula infecciosa está compuesta por una triple capa de proteínas (TLP), una capa central o core constituida por la proteína VP2, una capa media formada por la proteína VP6 y una tercera capa o capa externa formada por la proteína VP7. Unida a la proteína VP7 se encuentran las proteínas VP4 formando la espícula viral. Las TLP interactúan con receptores celulares mediante la proteína VP4 del virus (31). La proteína VP4, sufre proteólisis y genera las proteínas VP8 (28Kda, aa 1–247) y VP5 (60KDa, aa 248–776) (27, 28). La infección por los RVs es un proceso multipasos que involucra adhesión, penetración transcripción y traducción, formación del viroplasma, replicación del

genoma, maduración y liberación (29). La mayoría de los RV estudiados requieren para el paso de adhesión la región terminal o subterminal del ácido siálico (30). Se ha descrito que algunas especies pueden unirse también al antígeno histogrupa tipo A. Después de la unión inicial varias proteínas pueden actuar como correceptoras del rotavirus. Se ha descrito la interacción con varias proteínas heterodiméricas integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$, las cuales interactúan con motivos ligandos en VP5 o VP7. (motivo DGE en VP5 o RGD en VP7) o con la proteína de choque térmico Hsc70. Muchas de estas proteínas se han encontrado ubicadas en balsas lipídicas (31).

Conociendo esta característica del tropismo del RV por el enterocito y dado que las proteínas identificadas como receptoras son sobre expresadas en algunos tumores durante su transformación maligna, en nuestro laboratorio adaptamos en líneas celulares con sobreexpresión de proteínas de choque térmico varias especies de RV, mediante evolución dirigida (37). Uno de estos RV es el RV TRUYO el cual fue generado por pases continuos de 5 especies de RV que infectan animales: TRF (cerdo), RRV (mono Rhesus), UK (bovino), YM (cerdo) y OSU (cerdo). Esta mezcla condujo a la generación de un virus con características diferentes, lo cual fue demostrado por electroferotipo y por la capacidad de infectar células tumorales (37). La identificación de los receptores celulares de un VO es un prerequisite que orienta para el potencial uso del virus en los diferentes tipos de tumor. Durante la transformación maligna el incremento en la proliferación, evasión de la muerte y de la respuesta inmune, angiogénesis, invasión y metástasis de las células tumorales se ha detectado cambios en la expresión de proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70, Hsp27 y Hsp60) en las membranas de celulares tumorales (142, 143). Así mismo se ha detectado cambios en el perfil de expresión y actividad de las integrinas (116, 144). Varias integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha x\beta 2$) (31, 35, 83, 145) y proteínas de choque térmico (Hsc70, PDI) (33, 36, 85, 90, 91) participan en la entrada del RV silvestres en diferentes líneas celulares y en las vellosidades intestinales. Aunque se ha reportado previamente la expresión de proteínas de choque térmico y PDI en la membrana de células tumorales, no se conoce cuáles de estas proteínas se expresan en la línea celular MES-OV y si su expresión es usada por el RV modificado (RV TRUYO) durante los primeros eventos de infección. El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad y permisividad de una línea celular de cáncer de ovario (MES-OV) al RV TRUYO y determinar la importancia de las proteínas $\beta 1$, $\beta 3$, PDI, Hsc70, Hsp90, Hsp70, Hsp60, y Hsp40 durante el proceso infeccioso en estas células, así como también la capacidad de inducir muerte celular. Se detectó que este virus tiene la capacidad de infectar y replicarse en esta línea celular e inducir la expresión de marcadores de muerte. La susceptibilidad en gran parte es dada por la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70 y PDI expresadas en la superficie de estas células, demostrado

por ensayos inmunológicos. Adicionalmente se demostró que este virus usa la vía endocítica temprana durante la infección, determinado por su relación con la expresión de Rab5 en las células MES-OV infectadas.

4.2.2 Materiales y métodos

4.2.2.1 Anticuerpos y reactivos.

Sueros hiperinmunes contra RV generados en conejo, cobayo y cabra (producidos *in-house*). Para la generación de los anticuerpos se usó como antígenos péptidos de proteínas estructurales (SP) y no estructurales (NSP) de RV. Anticuerpos primarios policlonales (producidos *in-house*) contra proteínas humanas: Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, integrina β 1, integrina β 2, integrin β 3, los cuales fueron generados usando como antígeno los siguientes péptidos: para Hsp90 RDNSTMGYMAAKKHLEINPDHS (620-641); Hsp70 (HSPA4; UniProt) - QIQQYMKIISFFKNKEDQYDHL (705-727); Hsp70 HSPA4; UniProt) NSFTLKLEDTENWLYEDGDQPKQ (646-668); Hsp70 (HSPA4; UniProt) AMEWMNNKLNQKQSLTMDP (741-761); Hsp60 RLAKLSDGVAVLKVGGTSDVEVN (393-415); Hsp40 GSDVIYPARISLREALCGCTVNV (251-273); para Hsc70 and PDI, se usó la longitud completa de la proteína recombinante. Anticuerpos policlonal anti-cobayo (producidos *in-house*) contra proteínas no estructurales de RV, para esto se usó como antígeno las proteínas recombinantes: rNSP1, rNSP2, rNSP3, rNSP4, rNSP5 y rNSP6 de rotavirus RRV. Los plásmidos fueron amablemente donados por los doctores Carlos Arias and Susana López del Instituto de Biotecnología (UNAM, México). La proteína humana recombinante Hsc70 (rHsc70) y PDI (rPDI) fueron obtenidas de *Escherichia coli* (especie BL21 (DE3)) como fue descrito por Santana AY et al 2013 (36). Para la integrina β 3, la proteína aislada de plaquetas fue usada como antígeno. Los fragmentos F(ab)² de sueros hiperinmunes generados en conejo fueron obtenidos en nuestro laboratorio de acuerdo con protocolos estándar. Anticuerpos policlonales (pAbs) contra proteínas humanas: HSP 90 α / β (N-17; sc-1055), Hsp70 (K-20; sc-1060), Hsp 60 (N-20; sc-1052), Hsc 70 (K-19-, sc-1059), Hsp 40 (N-19; sc-1801), PDI (E-20; sc-17222), anti-integrina β 1 (L-16; sc-9936), anti-integrina β 2 (N-19; sc-6624), anti-integrina β 3 (sc-8626:). Anticuerpos monoclonales (mAbs) Hsp90 (sc-13119), Hsp 70 (sc-32239), Hsp 60 (sc-59567), Hsc 70 (sc-7298), Hsp 40 (sc-7298), PDI (sc-376369), anti-integrina β 1 (sc-374429), anti-integrina β 2 (sc-8420), anti-integrina β 3 (sc-46655). Anticuerpo secundario contra conejo conjugado con HRP- IgGs (sc-2313), anticuerpo secundario contra cabra conjugado con HRP- IgGs (sc-2020), Anticuerpo secundario contra conejo conjugado con HRP- IgG (sc-2030), anticuerpo secundario contra conejo conjugado con FITC- IgGs (sc-2359) (400 μ g/mL), anticuerpo secundario contra cabra conjugado con FITC – IgG (sc-2348). anticuerpo

secundario contra ratón conjugado con FITC IgG H&L, Alexa Fluor® 647 (ab150115), anticuerpo secundario contra conejo conjugado con Alexa Fluor® 555 (ab150062), anticuerpo secundario contra cabra IgG-PE (sc-3747), anticuerpo anti-Rab 5 (D-11) conjugado con Alexa flúor 647 (SC46692 AF647), anticuerpo anti-Rab 7 (B-3) con jugado con Alexa flúor 488 (SC376362 AF488) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anticuerpo anti-CD63 (NKI/C3) (ab215431; Abcam), anticuerpo anti- PARP1 “fragmentada” (ab2317, Abcam), anticuerpo control de isotipo IgG fue adquirido de IgG Agdia (Elkhart, IN, USA). TACS MTT Assays” de Trevigen, Inc. Complete TM Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail® (Millipore SiGMA), Protease Inhibitor Cocktail® (abm). Proteína A-Agarosa (Bio- Rad®; 90-180 µm). Metil-β-ciclodextrina (mβCD), paraformaldehído, BSA y cloruro de cesio fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO). Kit Apoptosis/necrosis ab176749 (Abcam®), Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific®), Human apoptosis antibody array Abcam® (ab134001; Cambridge, MA), Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® (C10247; Invitrogen®).

4.2.2.2 Líneas celulares.

La línea celular MES-OV CRL-3272™ fue obtenida de ATCC® (American Type Culture Collection). Las células CHO (Ovario de Hámster chino) y U-937 (Linfoma histiocítico) fueron proveídas por el Dr. Guerrero, Facultad de medicina, Universidad Nacional de Colombia. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en frascos de cultivo Corning® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La línea celular MES-OV fue cultivada en medio Mc Coy 5A (Gibco®). Las células CHO en medio DMEM (Gibco®). Las células U937 en medio RPMI (Gibco®). Todos los medios de cultivo se suplementaron SFB 10% (vol/vol) y los cultivos fueron mantenidos a 37°C, en atmosfera húmeda con 5% CO₂.

4.2.2.3 Propagación y purificación del RV TRUYO.

El RV TRUYO fue proveído por el Dr. Carlos Arturo Guerrero según el método descrito por Guerrero CA, et al 2016 (37) y fue propago en línea celular U-937 en la presencia de 1 µg/ml de tripsina. Las células fueron cultivadas en cajas T-75 (Corning®) hasta lisis celular (7-9 días) en medio RPMI sin SFB a 37°C en atmosfera húmeda con 5% CO₂. La purificación del virus se realizó mediante el uso de gradiente con cloruro de cesio (33). En breve, el lisado se centrifugó a 10.000 x g 40 min a 15°C. Se recolectó el sobrenadante y al precipitado se agregó cloroformo. Se agito por vórtex y el sobrenadante fue recolectado. Luego, los sobrenadantes fueron centrifugados a 108.600 x g por 60 minutos. Después de centrifugar, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en solución TSM (Tris 0.01 M, pH 7.4, NaCl 0.15 M, Mgcl₂ 0.001M), se adicionó freón (1,1, 2 Triclorotrifluoretano) en una relación de

1:3 (freón: virus) y se agitó por vórtex durante 5 minutos. La solución fue centrifugada a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Se adicionó nuevamente el 10% del volumen recuperado de TSM, se agito por vórtex y nuevamente se centrifugó. El procedimiento se repitió tres veces. Todos los sobrenadantes recuperados se mezclaron. Por uso de gradiente de cloruro de cesio se recolecto el RV. Para esto se colocó en un tubo de ultracentrífuga 0.5 ml cloruro de cesio (Sigma, St. Louis, MO, USA) con densidad 1.4157 g/cm³, 1 ml con densidad de 1.3039 g/cm³, y 0.5 ml con densidad 1.2070 g/cm³, y 0.5 ml con sacarosa (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 30% y se agregó el sobrenadante que contenía el virus. Se centrifugó a 101.500 x g por 90 minutos a 4 °C para sedimentar el virus. Las fracciones de DLPs y TLPs obtenidas fueron alicuotadas y guardadas a -70°C para preservación y uso en cada uno de los experimentos. (Anexo6)

4.2.2.4 Infección de células

5 X10⁴ células/pozo fueron sembradas en cajas multipozos y cultivadas en medio Mc Coy 5A suplementado con 10% de SFB durante 12 h. a 37°C con 5% de CO₂. Una vez adheridas las células, estas fueron lavadas con PBS para retirar el medio con SFB. Luego fueron inoculadas con diluciones seriadas de lisado rotaviral o TLPs obtenidas por cloruro de cesio; iniciando en dilución 1:50 hasta 1:6000, con volumen final de 50 µl e incubadas a 37 °C con 5% de CO₂ durante 12 h. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 37%. La presencia de antígenos virales fue evaluada mediante inmunocitoquímica (IHC) usando sueros hiperinmunes contra las proteínas estructurales del RV.

Para conocer si la línea de cáncer de ovario (MES-OV) es susceptible a la infección por RV TRUYO, células MES-OV adheridas a cajas multipozos (96 pozos), fueron lavadas dos veces con PBS e inoculadas con RV TRUYO utilizando diferentes MOI (MOI de 1, 5 y 10) activado con tripsina 1 µg/ml en medio RPMI. Luego las células fueron incubadas 12 h a 37° con 5% de CO₂. Separadamente se cosechó las células y el sobrenadante a las 0, 6, 8, 10 y 12 h.p.i. Las células fueron lisadas mediante 3 ciclos de congelación descongelación. Posteriormente, se centrifugaron a 600 x g durante 5 min, y se recuperó el sobrenadante. La producción de antígenos virales se evaluó en el sobrenadante y en el lisado celular mediante la técnica de ELISA de captura. Como no se encontraron grandes diferencias en la generación de antígenos virales se decidió utilizar en todos los demás experimentos MOI de 1.

Para evaluar si la línea celular infectada con el RV TRUYO genera viriones infecciosos, e indirectamente determinar el ciclo de replicación, se sembraron 5X10⁴ células MES-OV/poro. Posteriormente, se adicionó el RV (MOI de 1) durante 1h a 37°C con 5% CO₂. Luego de este periodo las células fueron lavadas dos veces con PBS para retirar el virus que no se unió y no infecto. Se agregó medio RPMI libre

de suero y las células y sobrenadante fueron recuperados por separado a las 0, 6, 8 10 y 12 h.p.i. Se realizó tres ciclos de congelación y descongelación con posterior centrifugación a 600 x g de las células en cada tiempo examinado. El sobrenadante contiene fundamentalmente partículas completas virales infecciosas (viriones) e intracelularmente pueden coexistir viriones y antígenos virales no ensamblados aun en viriones. Se conoce que solamente la partícula viral completa (virión) es infecciosa. Por esta razón, se aplicó mediante diluciones seriadas el sobrenadante o el sedimento celular a otro cultivo de MES-OV en monocapa. Estas nuevas células inoculadas con el sobrenadante, o el lisado celular, fueron fijadas con paraformaldehído al 37% 12 h.p.i. Luego los nuevos antígenos virales se evaluaron mediante el uso de inmunocitoquímica. La infección fue convertida a UFF/ml. El experimento se realizó tres veces por duplicado.

La susceptibilidad a la infección también se evaluó mediante epifluorescencia y citometría de flujo con MOI de 1, utilizando anticuerpos primarios que reconocen proteínas estructurales (Dilución 1:2000 vol./vol) y no estructurales (NSP1-NSP6) (Dilución 1:1000) y el anticuerpo monoclonal 159 (Dilución 1:1000.), el cual reconoce la proteína VP7 de RRV (146).

Para determinar si la infección del RV TRUYO se asocia con los microdominios lipídicos durante la entrada, las células fueron tratadas con m β CD 10 mM durante 1 hora a 37°C, lavadas con PBS, e infectadas con el RV TRUYO. La infección se comparó respecto a células no tratadas con m β CD y se evaluó mediante citometría de flujo.

4.2.2.5 Inmunocitoquímica

Para evaluar la infectividad, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y posteriormente lavadas con PBS. Se permeabilizaron con metanol absoluto frío a -20°C durante 1 h. Se realizó 2 lavados de 5 m con PBS. Se agregó solución de bloqueo (SFB al 3%) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Como anticuerpo primario se usó suero hiperinmune contra proteínas estructurales (Dilución 1:2000vol./vol) generado en conejo, el cual fue incubado 1 h a 37°C. A este suero hiperinmune previamente se había descartado reacción cruzada con antígenos celulares. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS e incubadas 1h a 37°C con anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (HRP, 0,13 μ g/ml). La reacción fue revelada usando como sustrato 0.64 mg/ml aminoetilcarbazol (AEC), buffer acetato (acetato de sodio 30 mM, ácido acético 12 mM), pH 5.0 y peróxido de hidrógeno al 0.36%. Se incubo durante 30 minutos a 37°C

La cuantificación se realizó por conteo de células positivas en microscopio invertido de luz clara usando el objetivo de 40 X y enfocando en 7 campos de la parte central del pozo. Se aseguró un promedio de

células positivas no mayor a 150 ni menor a 100. Con esta técnica se tituló el “stock” que se utilizó durante los experimentos y se calculó usando la siguiente fórmula: UFF/ml unidades formadoras de foco por ml = $20 \times$ número de células positivas en cada área \times factor de dilución del virus \times número de campos en cada pozo.

4.2.2.6 ELISA de captura.

Para evaluar la presencia de antígenos de RV en el sobrenadante o el lisado de células MES-OV inoculadas o no con RV TRUYO, se realizó ensayo de ELISA en sándwich tipo HADAS (Heterologous Double antibody Sandwich). Para esto, sueros hiperinmunes contra antígenos de RV generado en cobayo en dilución 1:1000 en PBS+BSA 3% fueron adheridos a la caja multipozo de poliestireno y fondo plano mediante incubación a 4°C toda la noche. Posteriormente se realizó dos lavados con PBS. Se bloqueó con leche descremada al 5%, 2 h. a temperatura ambiente. La caja fue lavada 3 veces con PBS. Se agregó por separado 100 μ l de sobrenadante o lisado celular recolectado en los tiempos indicados en el ensayo de determinación del ciclo de replicación. Como controles se agregó células lisadas sin infección o medio de cultivo libre de suero o PBS. Se incubó a 4°C durante 16 horas, luego se lavó tres veces con PBS. Se adicionó como anticuerpo primario sueros hiperinmunes contra proteínas de RV generado en conejo dilución 1:1000 en PBS+ BSA al 3% y se incubó 16 h. a 4°C. El anticuerpo no unido fue retirado por lavado dos veces con PBS. Luego se incubó durante 1 h. a 37°C con 0.13 μ g/ml de anticuerpo IgG anti-conejo conjugado con HRP. La placa fue lavada tres veces con PBS. El ensayo fue revelado utilizando buffer citrato y OPD (o-phenyldiamine dihydrochloride; PIERCE®) y H₂O₂. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ al 2N antes de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. La lectura fue realizada en lector de microplacas (Ultramark microplate reader. Modelo 8422, Biorad), a 490nm. Los datos fueron expresados como el Δ D.O después de restar la absorbancia del control o en porcentaje teniendo en cuenta el inverso del control negativo.

4.2.2.7 Ensayo de MTT

El efecto citotóxico inducido por el RV TRUYO fue evaluado por medio de la actividad mitocondrial de las células infectadas, usando el ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5) difenil tetrazolium bromuro). El ensayo fue realizado usando el kit “TACS MTT Assays” de Trevigen, Inc. Para esto a las células MES-OV inoculadas con el RV TRUYO en los tiempos y MOI indicados, se les agregó la sal de tetrazolio (reactivo MTT), se incubó durante 2 horas en oscuridad a 37°C. Posterior a esto se solubilizó

los cristales de formazan generados por las células metabólicamente activas. Se incubó durante 2 horas a 37°C. La absorbancia fue determinada a 650 nm en lector de microplacas (Ultramark microplate reader Modelo 8422, Biorad). Como control se usaron células sin infectar. Los datos son expresados en porcentaje con D.E de la actividad metabólica con respecto al control sin infectar.

EL ensayo de MTT también fue usado para evaluar si la incubación de células MES-OV con la porción F(ab)² de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1, β 3 afecta la viabilidad de estas células. Para esto las células fueron incubadas con la porción F(ab)² por 45 min a 37°C, luego se incubó por 45 m a 4°C, posterior a esto, fueron lavadas 3 veces con PBS y se agregó medio RPMI. Después de incubación por 12h a 37 °C con 5% de CO₂ se realizó el ensayo MTT como se describió anteriormente.

4.2.2.8 Bloqueo de la infección

Para evaluar si las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1, β 3 participan durante el proceso infeccioso del rotavirus TRUYO se utilizó la porción F(ab)² de los anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. Para esto, 5.0×10^4 células MES-OV fueron cultivadas en cajas de 96 pozos con medio suplementado. Las células adheridas fueron lavadas con PBS e incubadas por 45 min a 37°C, 5 % CO₂ de forma independiente con cada una de las porciones F(ab)² de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1, β 3 de origen conejo generados en nuestro laboratorio. Se usaron las concentraciones de 0,01mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,04 mg/ml. Cuando se incubó con la mezcla de todas las porciones F(ab)² de estos anticuerpos la concentración usada fue de 0,005mg/ml de cada una. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS una vez y a las células adheridas se les colocó medio Mc Coy 5 A libre de suero 15m a 4°C. Terminada la incubación, se inoculó el RV TRUYO (MOI 1) y se incubó por 45 m a 4°C. Luego se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ por 12h. El porcentaje de infección fue evaluado mediante IHC. Como control de bloqueo se usó anticuerpo no relacionado tipo IgG. El porcentaje de células infectadas fue relacionado con el control de infección sin bloqueo.

4.2.2.9 Obtención de fracciones enriquecidas de membranas celulares.

Células MES-OV fueron cosechadas y centrifugadas para obtener membranas enriquecidas de acuerdo al protocolo descrito por Lin et al 1987 (147). En breve, 1×10^8 Células MES-OV lavadas con PBS1 X, fueron tratadas con buffer hipotónico (5 mM Hepes, pH 7.4, 50 mM sacarosa) y lisadas usando un homogeneizador manual por 5 m Luego al homogenizado se le añadió 10mM de CaCl₂ y se centrifugó

a 3500 x g por 5 m a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y nuevamente centrifugado a 19800 x g por 30 m a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado fue recuperado y resuspendido en PBS1 X estéril conteniendo 0,02% de azida de sodio y mantenido a 4°C por un periodo máximo de 24 h.

4.2.2.10 Ensayo de unión

Para evaluar si las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1, β 3 de las células integras MES-OV participan en la unión del rotavirus TRUYO, las células fueron crecidas en placas de seis pozos y lavadas con medio RPMI dos veces. Luego, fueron incubadas con lisado de RV TRUYO (MOI de 5 previamente activado con tripsina 1 μ g/ μ l) en RPMI con 1% BSA frío. Se incubó durante 45 min a 4 °C. El complejo virus-células fue lavado tres veces con PBS y 1% BSA en frío para retirar el virus no unido. Se agregó buffer RIPA pH 8.0 (150mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris) + inhibidor de proteasas (Complete TM Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail @ 1 X + PMSF 2mM) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Las células fueron retiradas de la caja con rastrillo y pasadas a un tubo de 1,5ml a 4 °C. El lisado se adicionó a una placa de ELISA de captura, como se describió anteriormente. Como anticuerpo de captura se usó suero hiperinmune de cobayo (Dilución 1:1000) contra proteínas estructurales de rotavirus. Para detección de las proteínas humanas se usó 0,2 μ g/ml de pAbs generados en cabra contra las proteínas Hsp90 (sc-1055), Hsp70 (sc-1060), Hsp60 (sc-1052), Hsp40 (sc-1801), Hsc70 (sc-1059), PDI (sc-17222), β 1(sc-9936), β 2 (sc-6624) β 3 (sc-6627) de Santa Cruz Biotechnology Inc ®. Como control se incubó cada anticuerpo con PBS y en pozo separado se incubó el lisado celular con PBS.

Con el mismo propósito se utilizaron membranas enriquecidas de células MES-OV, estas fueron incubadas con aproximadamente MOI de 5 de un stock de virus con concentración 6.5×10^{11} UFF/ml de RV TRUYO overnight a 4°C. Se lavó 2 veces con PBS 1 X centrifugando a 7000 x g. El precipitado de membranas-virus fue lisado con buffer RIPA y se adicionó a una placa de ELISA de captura como se describió antes para las células integras. Se repitió el experimento realizado para evaluar unión con células integras descrito anteriormente, pero adicionalmente las membranas enriquecidas de células MES-OV fueron incubadas con sueros hiperinmunes que contenían la porción F(ab)'2 contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 3 de origen conejo (concentraciones de 0,01mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,04 mg/ml y 0,005 mg/ml). Se incubó durante 1 h. a 37°C. Las membranas celulares unidas al anticuerpo fueron lavadas con 1 ml de PBS y centrifugadas a 7000 x g durante 5 min a 4°C. El precipitado fue resuspendido en PBS estéril y al complejo membrana-anticuerpo se adicionó RV TRUYO (MOI de 5). Se incubó 1 h a 4°C. El complejo virus-membranas-ab fue lavado 1 vez con

PBS y 1% BSA en frío para retirar el virus no unido. Se agregó buffer RIPA y se incubó durante 30 minutos a 37°C. La unión fue evaluada como se describió para el ensayo de unión de célula completa. Como control se incubó la porción F(ab)'2 de cada anticuerpo con PBS y en pozo separado se incubó las membranas enriquecidas con PBS

4.2.2.11 Citometría de flujo y epifluorescencia (IFI)

Para evaluar si las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1, β 3 estaban presentes en la superficie de la membrana de células MES-OV se usó citometría de flujo y epifluorescencia. Para esto, células MES-OV fueron cultivadas en cajas T-75 a confluencia de 80%. Posteriormente fueron lavadas con medio libre de suero y despegadas con tripsina 0,25% (Gibco®), fijadas con paraformaldehído al 2% sin metanol (PFA) por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavarse 3 veces con PBS se incubaron con NH_4Cl 50mM durante 1 h. Se adicionó solución de bloqueo (SFB al 3% en PBS) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubaron durante 1 h a 37°C con pAbs contra cada una de las proteínas indicadas generado en cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc®). El anticuerpo fue usado en concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluido en solución de PBS con SFB al 1%. Seguido de 2 lavados con PBS, las células fueron incubadas con 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo secundario conjugado con ficoeritrina o FITC generado en cabra a 37°C durante 20 minutos. Como control, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario. Como control positivo, las células fueron permeabilizadas con saponina al 1% por 20 minutos para detectar la presencia de las proteínas internas. Para evaluar las proteínas por epifluorescencia, se siguió el mismo protocolo, pero las células fueron cultivadas en laminillas redondas de 12 mm y fijadas con PFA al 4%.

Para evaluar la presencia de antígenos virales, las células fueron inoculadas con RV TRUYO MOI de 1, luego 12 h.p.i fueron despegados con tripsina y centrifugadas a 600 x g. Luego se fijó con metanol frío durante 1 hora a -20°C, se siguió el protocolo descrito para la detección de proteínas celulares, pero como anticuerpo primario se usaron sueros hiperinmunes contra proteínas estructurales o no estructurales (NSP1-NSP6) contra RV (dilución 1:1000) en PBS + saponina 0,1%. Luego de incubación durante 1 h a 37 °C, las células fueron lavadas e incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo-FITC (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 minutos a 37 °C.

Para evaluar si la inoculación de RV TRUYO en células MES-OV generaba efectos citotóxicos se identificó la presencia de PARP1 fragmentada, porcentaje de células positivas para 7AAD y fosfatidilserina (PS) 12 h.p.i. Para esto las células MES-OV fueron infectadas como se describió en el

ensayo de infección. Se uso MOI de 1. La presencia de la proteína PARP1-cleaved fue evaluada de acuerdo al protocolo descrito arriba, pero usando como anticuerpo primario anti-Cleaved PARP1 (abcam) (0.2 µg/ml) y anticuerpo secundario anti-conejo-FITC (0,4 µg/ml). La exposición de la PS en la cara externa de la membrana celular y permeabilidad al agente intercalante 7-ADD se evaluó en células MES-OV inoculadas con rotavirus TRUYO como se indicó en el ensayo de infección mediante el uso de del kit Apoptosis/necrosis ab176749 (abcam®) de acuerdo con las instrucciones de la manufacturera. Como control de muerte relacionada con apoptosis, las células fueron expuestas a 100mM de Doxorubicina por 6 h. ó 200 µM de cisplatino durante por 12 h. La presencia de los antígenos fue analizada por uso de un citómetro de flujo FACS Canto™ II BD ® y software FlowJo_V10® o en microscopio de fluorescencia Leyca DM 2500. Se tomaron fotografías usando objetivo de 20X y 40X. En IFI, como contratinacion de nucleó se agregó 3ng/ml de colorante Hoechst 33342. Las imágenes fueron analizadas usando el software Image J2 (148)

4.2.2.12 Microscopia confocal.

Para evaluar si las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β1 y β3 colocalizan con antígenos del RV en la membrana de células MES-OV, se realizó microscopia confocal. 2×10^3 células MES-OV fueron sembradas en laminillas de vidrio cubreobjetos de 12 mm en medio Mc Coy 5A suplementado con 10% de SFB durante 12 h. a 37°C con 5% de CO₂. Las células fueron lavadas con PBS , e incubadas durante 3 m con TLPs de RV (MOI de 2) a 4°C. Posteriormente se lavó con PBS y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%. Se siguió el protocolo descrito para epifluorescencia. Para la detección de las proteínas se usó 0,2 µg/ml de mAbs dirigidos contra cada una de las proteínas generados en ratón: Hsp 90 (sc-13119), Hsp 70 (sc-32239), Hsp 60 (sc-59567), Hsc 70 (sc-7298), PDI (sc-376369), anti-integrina β1 (sc-374429), anti-integrina β2 (sc-8420), anti-integrina β3 (sc-46655). Como anticuerpo contra RV se usó sueros hiperinmunes contra proteínas estructurales de RV generad en conejo (dilución 1:1000). Como anticuerpo secundario se usó 0,4µg/ml de anticuerpo Goat Anti-Mouse Alexa Fluor® 647 (ab150115) y Donkey Anti-Rabbit IgG H&L, Alexa Fluor® 555 (ab150062)

Los rotavirus establecen interacciones iniciales con moléculas de la membrana celular, luego deben internalizarse para liberar DLPs en el citoplasma e iniciar los siguientes pasos de la infección. Se ha propuesto que los RV entran por directa penetración de la membrana o a través de diferentes vías endocíticas dependiendo de la especie evaluada (75, 149). Para conocer si el RV TRUYO usa la vía endocítica evaluamos por microscopia confocal la colocalización del RV TRUYO. Para esto las células

fueron sembradas en laminillas cubreobjetos como se indicó anteriormente. Las células fueron inoculadas con TLPs de RV (MOI de 2) previamente activadas con tripsina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Posteriormente fueron incubadas a 37°C durante 2, 5, 10, 20, 50 y 80 m Posteriormente fueron evaluadas para la presencia de Rab5, Rab7 y CD63 usando los anticuerpos: anti-Rab 5 (SC-46692 AF647), anti-Rab 7 (SC376362) y anti-CD63 (ab215431). La presencia de RV fue evaluada mediante sueros hiperinmunes contra rotavirus producidos en conejo. Como anticuerpo secundario se usó el anticuerpo anti-conejo, Alexa Fluor® 555 (ab150062).

Las células fueron visualizadas en microscopio confocal de barrido laser Olympus FV1000 equipado con objetivo 60x/1.42 oil PlanApo N. Se realizaron secciones ópticas de 1 micra Las imágenes fueron analizadas en el software Fiji (150)

4.2.2.13 Microscopia electrónica de transmisión

Se realizó TEM para evaluar la estructura y mecanismo de entrada del RV TRUYO a las células MES-OV. Para esto las células MES-OV fueron inoculadas con TLPs de RV TRUYO (MOI de 2) e incubadas a 37°C. Las células fueron fijadas 2 y 20 m después de añadir las TLPs de RV con glutaraldehído al 2.5%. Las células fueron coloreadas con tetróxido de osmio (1%), lavadas y deshidratadas con concentraciones ascendentes de etanol acetona (75%, 90% y 100%), luego fueron incluidas en resina epoxica Spurr (polimerizado 18 h a 70°C). Luego, se realizaron cortes de 1 μ de grosor y fueron teñidos con azul de Toluidina para MOAR para seleccionar por microscopia de luz la zona más apropiada para examinar. Posteriormente, se realizaron cortes finos con cuchilla de diamante, 100-120 nm de grosor, y se colocaron en rejillas de cobre. Se contrastaron con acetato de uranilo (1%) y citrato de plomo para su observación en TEM. Las imágenes fueron adquiridas en el Microscopio Electrónico de Transmisión *Jeol 1400 plus a 80 KV*.

4.2.2.14 Purificación de micro dominios de membranas resistente a detergentes.

Para evaluar la presencia de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1, β 3 en microdominios lipídicos de la membrana plasmática se siguió el protocolo descrito por Santana A, et al 2013 (36). En Breve, 1.9×10^7 células fueron tratadas o no con 10mM de β -metil-ciclodextrina (β -MCD) por 1 hora a 37°C y posteriormente lavadas con PBS Luego las células fueron despegadas con rastrillo y lisadas con buffer de lisis "raft" (50mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2mM DTT, Triton X-100 1% and "cocktail" de inhibidores de proteasas (100mM PMSF, 2mM bestatina, 0,3mM pespstatina

A, y 0,3 mM E-64, abm®) a 4°C durante 30 minutos. El lisado obtenido fue centrifugado en gradiente lineal de sacarosa (5-40% peso/vol.) en rotor SW60 Sorvall durante 5 horas a 200.000 x g a 4°C. Posterior a esto, se tomaron fracciones sucesivas de 500µl iniciando desde las fracciones de menor densidad (parte superior del tubo: fracción #1) hasta las de mayor densidad (fondo del tubo: fracción # 8). Para solubilizar los lípidos y evaluar unión peptídica, se adiciono buffer RIPA a cada una de las fracciones obtenidas y se incubo durante 30 m a 37°C. Las proteínas fueron detectadas por ELISA de captura con sueros hiperinmunes generados en conejo (Dilución 1:2000) contra las proteínas Hsc70 o Hsp60. Como anticuerpos primarios para la detección de cada una de las proteínas se usaron pAbs generados en cabra contra cada una de las proteínas indicadas (Santa Cruz Biotechnology Inc®), como anticuerpo secundario se usó 0.13 µg/ml de anticuerpo IgG anti-cabra conjugado con HRP La reacción fue desarrollada usando el sistema HRP/H₂O₂/OPD como se describió en el ensayo de ELISA. El ensayo fue realizado por duplicado en dos experimentos independientes.

4.2.2.15 Arreglo de proteínas de apoptosis (Human apoptosis antibody array)

Se uso el arreglo de proteínas "Human apoptosis antibody array Abcam® (ab134001; Cambridge, MA) para simultaneamente detectar los niveles relativos de 43 proteínas relacionadas con muerte celular en los lisados de células MES-OV infectadas con RV TRUYO. Para esto, 1 x10⁷ células MES-OV fueron inoculadas con RV TRUYO MOI de 1, 12 h.p.i las células fueron recolectadas con rastrillo y posterior centrifugación a 800 x g por 10 minutos. El precipitado fue recolectado para extracción de proteínas y 2,5 µg/µl fueron usadas para la detección de las proteínas en cada membrana de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. La señal de quimioluminiscencia fue evaluada con ChemiDoc MP Imaging System, BioRad®. La intensidad de la señal de cada membrana fue medida usando el software Image J® (148). La intensidad de cada punto fue medida y normalizada con control interno de carga de cada membrana. La intensidad de la señal de cada proteína fue obtenida por normalización del spot de cada proteína en la membrana con lisado de células tratadas (RV TRUYO ó 200µM de cisplatino) con el spot de la misma proteína en la membrana control (sin tratamiento).

4.2.2.16 Análisis de TUNEL por microscopia de fluorescencia.

Para evaluar si el RV TUYO induce fragmentación de DNA durante la infección en la línea célula MES-OV, 8 X10⁵ células fueron inoculadas con RV TRUYO (MOI de 1) como se describe en el ensayo de infección. La estimación de la fragmentación del DNA se realizó usando el ensayo de TUNEL. Para

esto se utilizó el kit Click-iT® TUNEL Alexa Flúor®. Se siguieron las instrucciones de acuerdo con el fabricante. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio de fluorescencia Leyca 2500.

4.2.2.17 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico a partir de la naturaleza de las variables, para las variables cualitativas se registraron frecuencias absolutas y frecuencias relativas en término de porcentajes; para las variables cuantitativas se registraron medidas de dispersión y medidas de tendencia central conforme a la significancia de las pruebas de normalidad generadas, para nuestro caso se registraron datos como medias y desviaciones estándar.

La significancia estadística fue determinada por comparaciones múltiples usando el test ANOVA de Sidak-Bonferroni, con un alfa de 5%. La correlación estadística para las variables cuantitativas se generó por el test de Pearson.

Para todos los ensayos, los datos son representados como la media de duplicados en al menos dos experimentos independientes, las barras de error en las gráficas indican la desviación estándar.

4.2.3 Resultados

Las células MES-OV de cáncer de ovario son susceptibles y permisivas a la infección por rotavirus TRUYO. Con el objetivo de determinar la susceptibilidad de las células MES-OV a la infección por el RV TRUYO, las células fueron inoculadas con MOI de 1, 5 y 10. Separadamente se recolectó el sobrenadante y las células adheridas fueron cosechadas a las 0, 6, 8, 10 y 12 h.p.i., los antígenos virales fueron evaluados por medio de ELISA de captura usando sueros hiperinmunes contra proteínas estructurales de RV. Se encontraron antígenos virales en el sobrenadante desde las 6 h.p.i., con un pico máximo a las 10 y 12 h.p.i. (Fig. 4A). En el lisado celular se encuentran antígenos desde las 6 h.p.i. y la concentración máxima de antígenos fue a las 10 h.p.i. (Fig. 4B). No se encontraron grandes diferencias en la generación de antígenos virales al infectar con los diferentes MOI y se decidió utilizar en todos los demás experimentos MOI de 1. La infección con MOI de 1 se evaluó mediante epifluorescencia y como control se usó la línea celular no tumoral “Chinese hamster ovary cell” (CHO), la cual ha sido reportada como resistente a la infección para especies silvestres de RV (35). (Fig. 4C). Para evaluar la generación de viriones se repitió el experimento anterior, infectando con MOI de 1, y obteniendo separadamente el sobrenadante y el lisado celular a las 0, 6, 8, 10 o 12 h.p.i. Nuevas células MES-OV fueron inoculadas con diluciones de lisado celular o del sobrenadante obtenido en los diferentes tiempos recolectados. Posterior a la infección, se recolectó separadamente el sobrenadante

y las células a las 12.h.p. i. Se encontró que tanto el sobrenadante como el lisado celular contenían viriones con capacidad infectiva desde las 6 h.p.i., con una concentración máxima a las 10 h.p.i. de 1.6×10^6 UFF/ml (Fig. 4D). Esto indica que las células MES-OV son susceptibles a la infección, el ciclo de replicación del virus se encuentra entre 8 a 10 horas y producen viriones maduros que son liberados constantemente al medio desde las 6 h.p.i. La infección (MOI 1) también fue evaluada mediante la técnica de citometría de flujo encontrando a las 12 h.p.i infección del 58% (Fig. 4E). Con citometría de flujo también se evaluó la infección (MOI 1) utilizando anticuerpos contra proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) a las 12 h.p.i. Se encontró con NSP1 43.8%, NSP2 40.2%, NSP3 48.2%, NSP4 29%, NSP5 30.9%, NSP6 21.2% (Fig. 4F). Con el anticuerpo monoclonal 159, que reconoce VP7, se halló una infección de 83% (Fig. 4F).

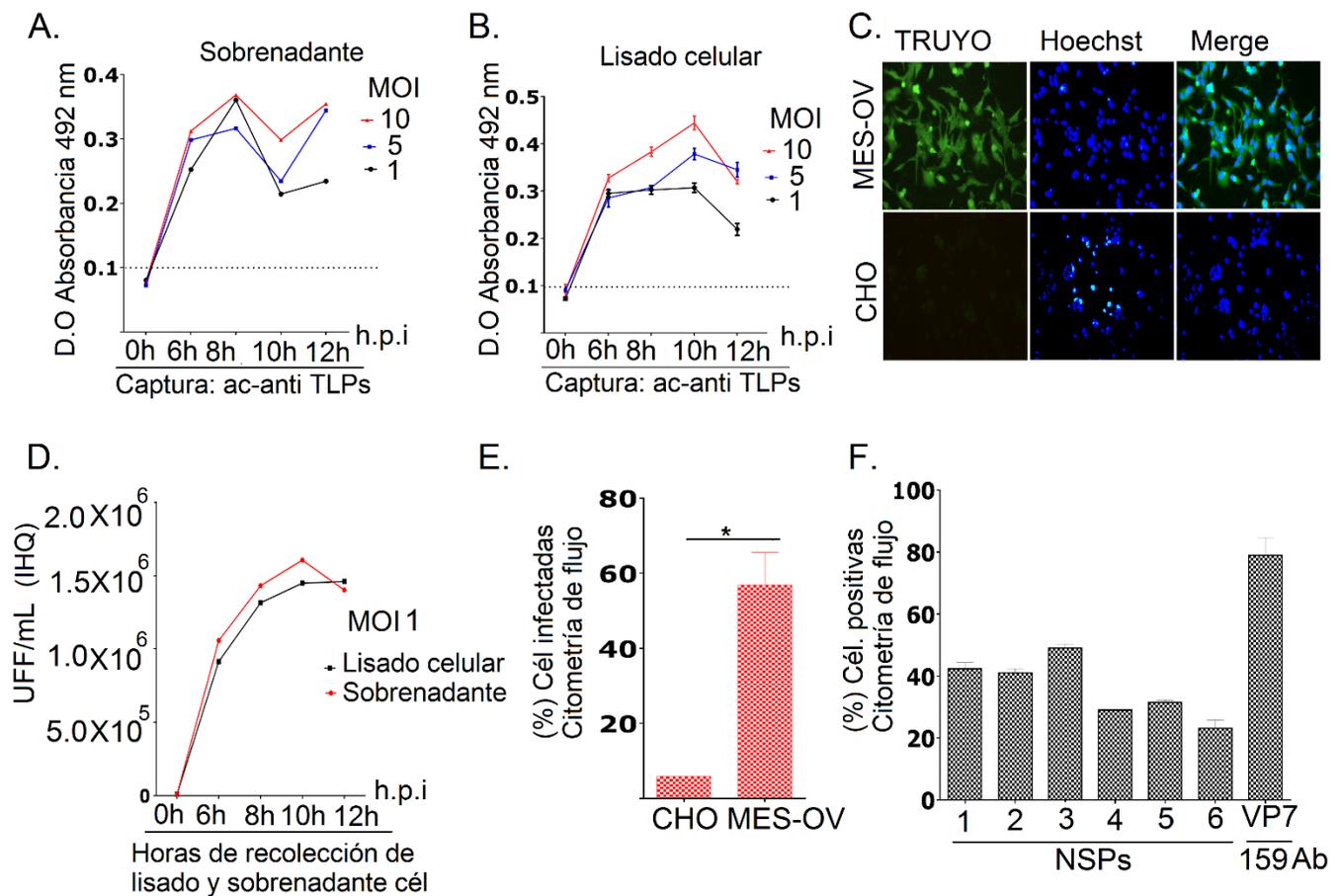


Fig. 4 Susceptibilidad, cinética de replicación y permisividad de la línea celular MES-OV de cáncer de ovario a la infección por RV TRUYO. Células MES-OV fueron infectadas con RV TRUYO en MOI de 1, 5 y 10 e incubadas en los tiempos indicados a 37°C. Después de la incubación, el sobrenadante fue removido, y las células fueron expuestas a 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento para lisis. Luego los lisados celulares y sobrenadante fueron usados para evaluar la

presencia de antígenos virales por ensayo de ELISA, en **A.** Lisados celulares y en **B.** Sobrenadante. **C.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de línea celular MES-OV y CHO infectadas con RV TRUYO (MOI 1 a 12 h.p.i.). Los antígenos de RV fueron detectados usando sueros hiperinmunes contra proteínas estructurales de RV (verde), como contratación se usó Hoechst (azul). **D.** Células MES-OV fueron inoculadas con diluciones de sobrenadante y lisado celular obtenido de A y B, y 12 h.p.i las células fueron lavadas y fijadas con PFA 4%. Los antígenos de RV fueron detectados por IHC usando sueros hiperinmunes contra rotavirus como ab primario y secundario conjugado con HRP. Las células positivas fueron cuantificadas usando microscopía de luz. **E.** Cuantificación por citometría de flujo de células MES-OV y CHO inoculadas con RV TRUYO (MOI 1, 12 h.p.i.). **F.** Perfil de citometría de flujo de células infectadas con RV TRUYO (MOI 1, 12 h.p.i.) para detectar proteínas no-estructurales. Se detectó VP7 de RV con ab 159. Las proteínas NSP de RV fueron detectadas usando sueros hiperinmunes contra NSP1-NSP6 de RV. Barra de errores indican la D.E (n=3), *p<0,05.

Las células MES-OV expresan las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI y β 1 en la membrana citoplasmática Para determinar si las células MES-OV expresan proteínas en la superficie de la membrana celular que han sido relacionadas con la entrada del RV silvestre (α 2 β 1, α 4 β 1 α v β 3, α x β 2) (31, 35, 83, 145), proteínas de choque térmico (Hsc70, PDI) (33, 36, 85, 90, 91) y proteínas asociadas al desarrollo del tumor, primero identificamos si las células MES-OV expresan estas proteínas en la membrana celular. Por citometría de flujo e IFI se detectó la presencia de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI, β 1, β 2 y β 3 en la membrana citoplasmática de estas células. Las proteínas que se encontraron en mayor expresión fueron la proteína Hsp70, integrina β 1 y Hsp 90 en el 45%, 78% y 22% de células, respectivamente. Las proteínas con menos expresión en células MES-OV fueron en orden decreciente β 3 (5%), Hsp40 (9) y β 2(11) (Fig. 5A y B). En cuanto a la intensidad media de fluorescencia las proteínas Hsp70 y Hsp60 presentaron la mayor IMF (Fig. 5C).

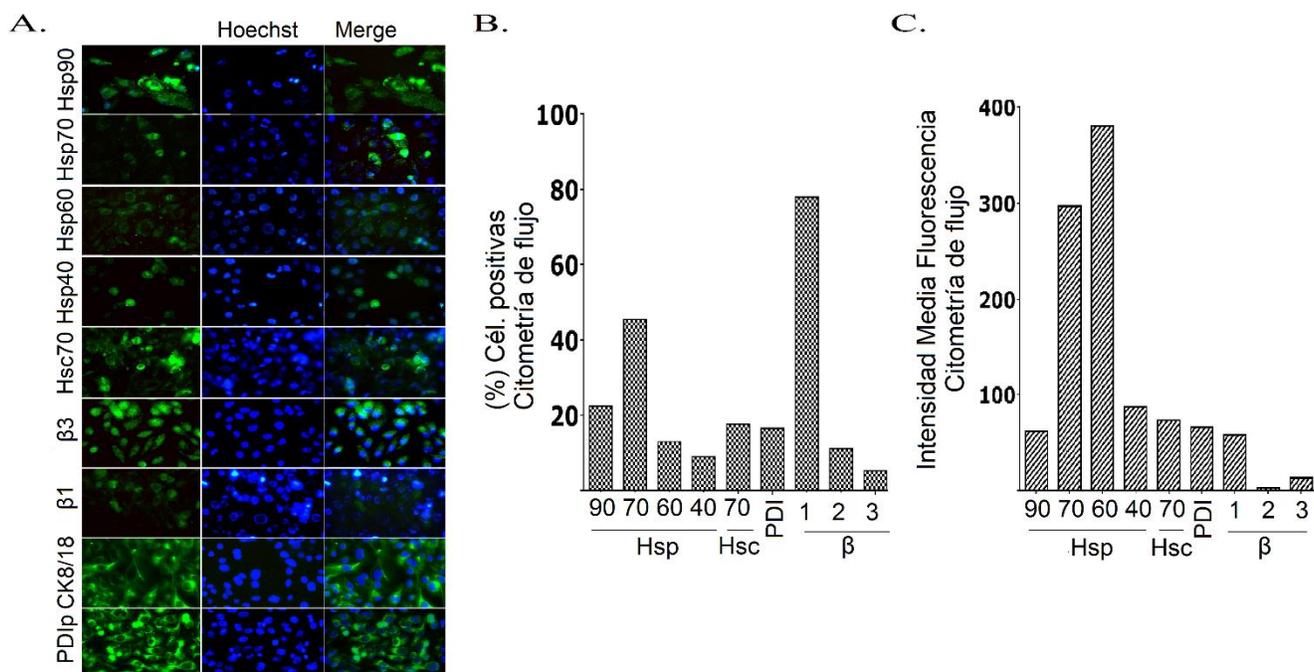


Fig. 5 Proteínas de choque térmico 90, 70, 60, Hsc 70, PDI, β 1 and β 3 son localizadas en la superficie celular de células MES-OV. **A.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia para cada proteína evaluada en células MES-OV. CK8/18 fue analizada para caracterizar la línea celular. La proteína PDI (PDIp.) fue evaluada en células permeabilizadas con saponina al 0,1 % como control. **B.** Cuantificación de la expresión de las proteínas en la membrana células MES-OV por citometría de flujo. **C.** Intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada proteína determinada por citometría de flujo.

Las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI, Hsc70 de la superficie celular participan en los primeros eventos de la infección. Para determinar si las proteínas de choque térmico, junto con β 3, y PDI participan durante la entrada de TRUYO a la célula, las células MES-OV previamente incubadas durante 45 m a 37°C con la porción F(ab)² del ab contra cada proteína afectan la infección. Se encontró diferencias en la infección con RV TRUYO en células previamente tratadas con la porción F(ab)² contra Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI entre 30 a 70% comparada con células no tratadas ($p < 0,001$) (Fig. 6A). El uso de concentraciones decrecientes de la porción F(ab)² de cada ab también mostró diferencias significativas ($p < 0,001$). Concentraciones de 0,01mg/ml, 0,02mg/ml y 0,04 mg/ml de la porción F(ab)² contra Hsp90 mostraron disminución de la infección en 52,5%, 71,5% y 81%, y en Hsp70 la disminución fue 70%, 82% y 87% respectivamente ($p < 0,01$). La incubación previa a la infección con la porción F(ab)² contra las proteínas Hsp60, Hsc70, y PDI mostraron disminución en la infección. Sin embargo esta disminución no fue significativa en ninguna concentración ($p > 0,05$) (Hsp60: 0,01mg/ml =47%; 0,02mg/ml=54% y 0,04 mg/ml=59%), (Hsc70 :0,01mg/ml =53%; 0,02mg/ml=59% y 0,04 mg/ml=65%) y

(PDI 0,01mg/ml =57%; 0,02mg/ml=61% y 0,04 mg/ml=74%). Mientras que el uso de la porción F(ab)² contra las proteínas Hsp40 y β 3 previos a la infección no mostraron disminuir la infección. Igualmente, el uso de anticuerpos no relacionados (IgG1) no afecto la infección de las células MES-OV comparada con el control sin tratamiento previo. Este resultado muestra que la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70 y PDI participan en los primeros eventos de infección del RV TRUYO en células MES-OV. Adicionalmente, incubación previa a la infección de la mezcla de la porción F(ab)² contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60, PDI y β 3 en concentraciones más bajas a las usadas de forma individual (0.05 mg/ml de cada una) disminuyó la infección en 80% ($p < 0,001$) (Fig. 3A.) El tratamiento previo a la infección con RV TRUYO con la porción F(ab)² de cada ab no afecta la viabilidad de las células MES-OV demostrado por el ensayo de MTT (Fig. 6B).

Para determinar si la susceptibilidad de las células MES-OV a la infección por RV TRUYO dependen de la capacidad del virus de unirse a estas proteínas, se evaluó la unión de RV TRUYO, a células vivas o membranas enriquecidas de células MES-OV mediante el ensayo de ELISA de captura. Como Ac de capturado se usó un ab contra rotavirus. Las proteínas Hsp90, Hsp60, Hsc70, PDI y β 1 muestran ser positivas en el lisado celular capturado con ab contra rotavirus. Las proteínas que presentaron mayor porcentaje de unión (determinado por la absorbancia) en orden descendente fueron Hsp70 (75%), Hsp60 (53,6), Hsc70(69%), PDI (51%) y β 1(84%) y las que presentaron menor absorbancia fueron la Hsp90 (41%) y β 3 (10%) (Fig. 6C). Se repitió el experimento utilizando fracciones enriquecidas de membrana citoplasmática. Las proteínas que presentaron mayor porcentaje de unión (determinado por la absorbancia) fueron las proteínas PDI (71%), β 1(57%), Hsc70 (55%), Hsp90 (43%) y Hsp70 (45%) ($p < 0,001$). y las de menor absorbancia fueron Hsp60 (17%) y Hsp40(9,1%) ($P > 0,05$). La incubación previa de las membranas enriquecidas con la porción F(ab)² previa a la incubación con RV TRUYO mostró disminución en la absorbancia indicada anteriormente (Fig. 6D). En conjunto, los resultados sugieren que estas proteínas pueden participar simultáneamente o en complejo (clúster) durante las primeras fases de infección del rotavirus TRUYO.

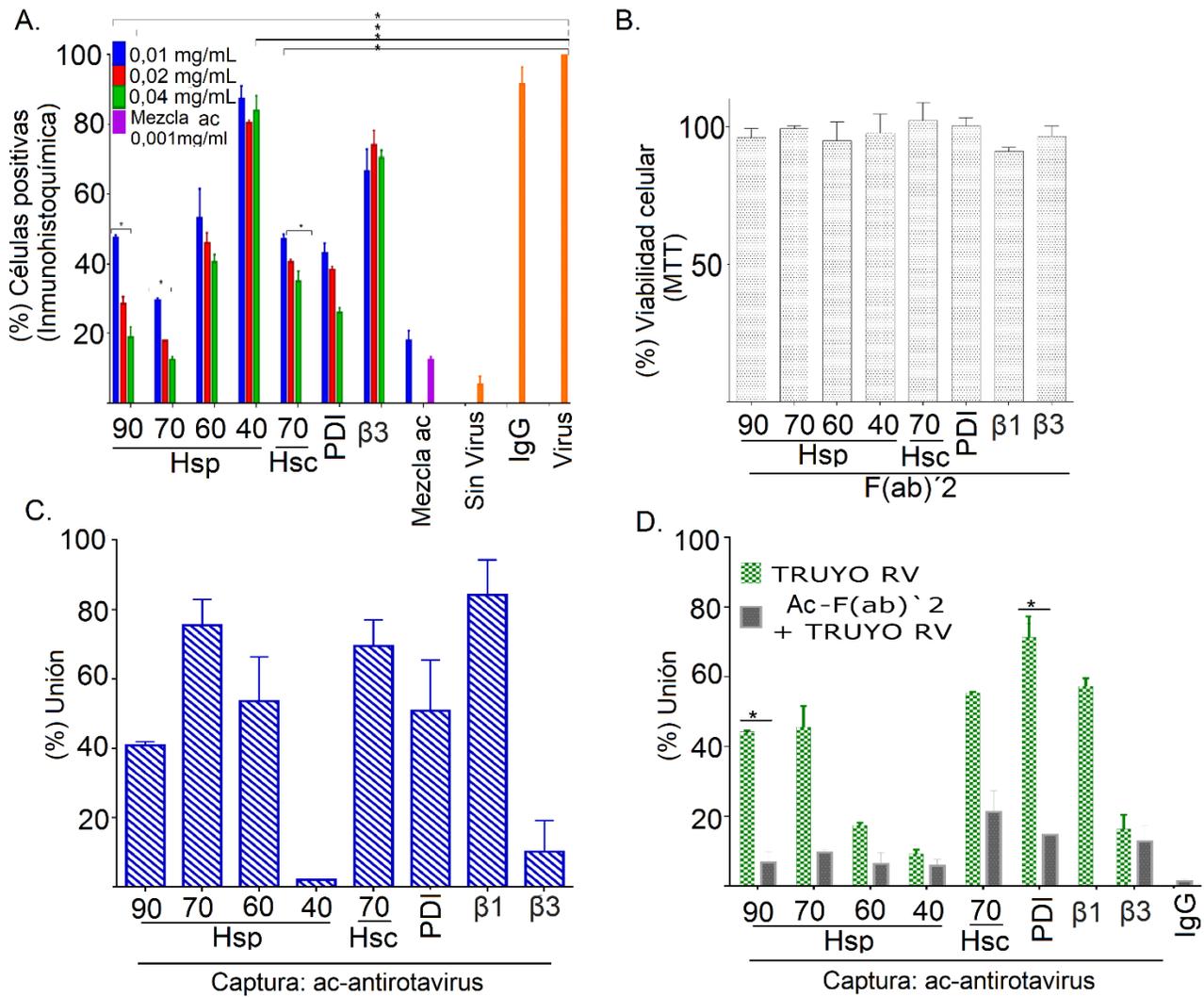


Fig. 6 Las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI, Hsc70 participan en las primeras fases de infección del RV TRUYO en MES-OV. **A.** La porción F(ab)² contra Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, PDI Hsc70, β3 fue adicionada a células MES-OV en monocapa por 45 m a 37°C. Después de la incubación, las células fueron lavadas con medio RPMI, e incubadas por 15 m a 4 °C. Luego se inoculó RV TRUYO (MOI 1), se incubó por 45 m a 37°C, se lavaron una vez y se incubaron por 12h a 37°C. Las células MES-OV fueron fijadas con el sistema HRP. Los datos son expresados como porcentaje de infección comparado con células sin bloquear (Control). **B.** Viabilidad de células MES-OV en presencia de la porción F(ab)² medido por el ensayo de MTT. **C.** RV TRUYO (MOI 1) fue adsorbido por 45 m a 4°C con células MES-OV. Después las células fueron lisadas con RIPA, y la detección de las proteínas fue determinada por ELISA DE Captura usando como captura anticuerpo contra RV. **D.** Membranas enriquecidas fueron tratadas como en A y las proteínas fueron detectadas usando ELISA de captura. Barra de errores representan tres experimentos independientes por duplicado. *P<0,001 Mix ab*: Mezcla de todas las porciones F(ab)² a concentración de 0,005mg/mL

Las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI, Hsc70, PDI, β 1 se ubican en balsas lipídicas y participan en la infección de rotavirus TRUYO. Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana ricos en colesterol, esfingolípidos y proteínas ancladas a GPI (Glicosilfosfatidilinositol) que funcionan como plataformas para iniciar o transmitir señales celulares y participan en la entrada, ensamblaje y liberación de virus, entre los que se encuentran el rotavirus (151-155). Para determinar esto, células MES-OV fueron lisadas, las fracciones separadas en un gradiente de sacarosa y los lípidos de cada fracción fueron disueltos con buffer RIPA. La presencia de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI, Hsc70, PDI, β 1 en cada fracción recuperada se evaluó por ensayo de ELISA de captura. Como anticuerpo de captura se usó el ab contra la proteína HSC70, dado que se ha reportado previamente estar asociado a balsas lipídicas y estar implicado en la entrada de varias especies de rotavirus (156). Las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI e integrina β 1 fueron detectadas en mayor concentración en las fracciones superiores (1, 2, 3) y en menor concentración en las fracciones de alta densidad (6,7 y 8) (Fig. 7A), indicando que estas proteínas se encuentran formando complejos con la proteína Hsc70. Al repetir el ensayo, utilizando como Ac de captura anticuerpo contra la proteína Hsp60 se detectó que las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI, β 1 pueden estar formando complejo con Hsp60 en microdominios lipídicos recuperados en las fracciones 1, 2 y 3 (Fig. 7B). El tratamiento de las células MES-OV con m β CD 10 mM (38) durante 1 h a 37°C, mostró cambio en el patrón de distribución de estas proteínas, apoyando que las proteínas se ubican en las balsas lipídicas. Otro control utilizado fue GM1, el cual es enriquecido en microdominios (157), se encontró principalmente en fracciones superiores 1, 2 y 3 correspondientes a fracciones de baja densidad (Fig. 7C) y la extracción de colesterol con m β CD 10mM cambio el gangliósido GM1 a fracciones de alta densidad (3 a la 8) (Fig. 7C). Estos resultados confirman que las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI, β 1 se encuentran en microdominios lipídicos.

Posteriormente evaluamos si el RV TRUYO se une a proteínas ubicadas en fracciones de balsas lipídicas, para esto las ocho fracciones obtenidas por gradiente de sacarosa y ultracentrifugación fueron incubadas a 37°C con 2×10^6 UFF/ml de RV TRUYO y la unión fue evaluada por ELISA, con ab de captura contra Hsc70 y ab primario contra RV. El precipitado en cada fracción con el ab contra Hsc70 contiene antígenos de RV. La mayor concentración se encontró en las fracciones 2, 3, 4 y 5 (Fig. 7D), confirmando que la proteína Hsc70 participa en la unión e RV TRUYO a las células MES-OV. Para evaluar si la depleción de colesterol con m β CD afecta la unión de RV TRUYO a las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI, Hsc70, las células vivas fueron tratadas con o sin m β CD 10mM por 1 h a 37°C y luego fueron incubadas con RV TRUYO a MOI 5. La unión fue evaluada por ELISA de captura usando suero hiperinmune contra RV y ab primario contra las proteínas indicadas. Las células tratadas con

m β CD 10mM mostraron mayor absorbancia, respecto a las no tratadas, sugiriendo que TRUYO se une más fácilmente o en mayor cantidad a las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60 y Hsc70, cuando dichas proteínas no están en las balsas lipídicas (Fig. 7E).

Para identificar si las balsas lipídicas son determinantes durante la entrada del RV TRUYO a la célula, se removió el colesterol de las membranas plasmáticas de células MES-OV con m β CD 10mM por 1 h a 37°C y luego se infectaron con RV TRUYO MOI 1. Los resultados indican disminución del número de células infectadas comparado con células no expuestas a m β CD (16,5% Vs 68%, respectivamente) (Fig. 7F). La exposición de las células a m β CD en concentración de 10mM no impacta en la viabilidad celular indicado por ensayo de MTT (Fig. 7G), apoyando que la ubicación de las proteínas celulares en las balsas lipídicas es determinante para el proceso infeccioso, pero no para la unión. Probablemente la integridad de la balsa lipídica es requerida para la clusterización de estas proteínas y entrada del virus

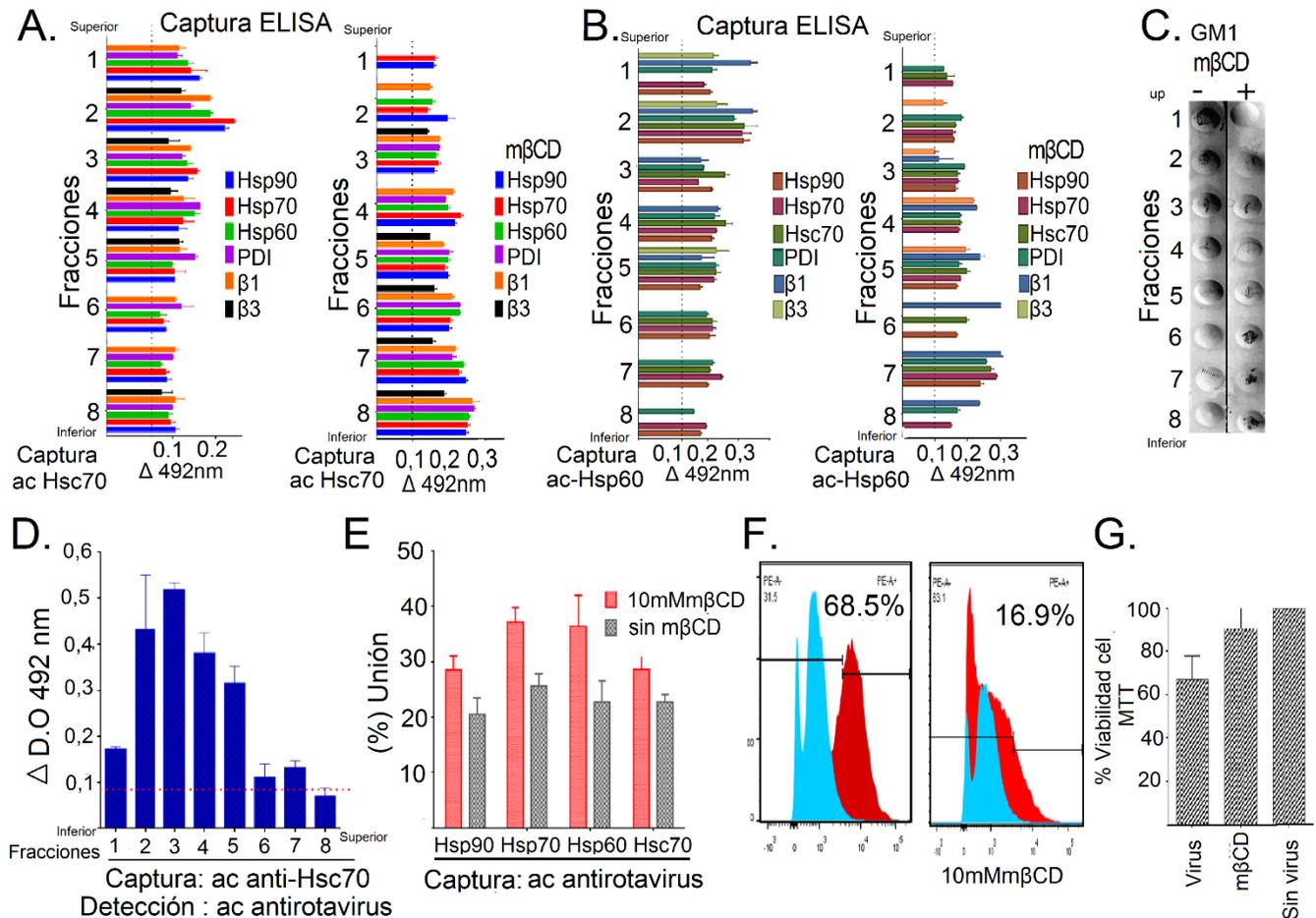


Fig. 7 La infección de rotavirus TRUYO depende de la localización de proteínas en balsas lipídicas. Detection of Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI, Hsc70 proteins in lipid rafts.

Células MES-OV con o sin tratamiento con m β CD (10mM 1h at 37°C) fueron sujetas a lisis con buffer (50mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2mM DTT, Tritón X-100 1%) a 4°C. Luego el lisado es usado para obtener balsas lipídicas por gradiente de sacarosa y ultracentrifugación. Las proteínas fueron detectadas por ELISA de captura usando como anticuerpo de captura sueros hiperinmunes en **A**, Hsc70 and in **B**. Hsp60. **C**. Inmunodot para la detección de GM1 en fracciones celulares obtenidas como se describe. **D**. RV TRUYO (200.000 UFF/ml) fue adsorbido por 45 m a 4°C con 8 fracciones obtenidas de balsas lipídicas. Después los complejos fueron lisados con RIPA , y lavados con PBS, y las proteínas fueron detectadas por ELISA de captura. Se usó como captura sueros hiperinmunes contra RV. **E**. Ensayo de unión para la detección de proteínas en lisados celulares tratados m β CD e incubados con RV TRUYO. La presencia de las proteínas fue determinada por ELISA de captura. Como capture se usó sueros hiperinmunes contra RV. **F**. Células MES-OV con o sin tratamiento con m β CD (10mM 1h a 37°C) fueron evaluadas para cuantificar la infección por citometría de flujo. **G**. Viabilidad de células tratadas o no con 10mM de m β CD fue evaluada por el ensayo de MTT.

Dado que los ensayos anteriores permitieron mostrar que las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI, Hsc70 participan durante las primeras fases de infección del RV TRUYO en las células MES-OV, determinamos cuál de estas proteínas colocaliza con el RV. Para esto monocapas de células MES-OV adheridas fueron inoculadas con MOI de 3 a 4°C durante 2 minutos. La inmunofluorescencia mostró diferentes grados de colocalización entre proteínas estructurales del RV y algunas de las proteínas celulares examinadas (Fig. 8A). La señal de colocalización fue analizada usando los métodos de Pearson, costes, y Mander`s (158). El coeficiente de Pearson es una medida exacta de la correlación cuando la intensidad de las dos señales analizadas es similar. Este coeficiente mostró que las proteínas Hsc70 ($r=0,73$), Hsp90 ($r=0,70$), y Hsp60 (0,67), β 1(0,59) y PDI (0,54) colocalizan con el RV mientras que las proteínas Hsp70 (0,31) y β 3 (0,22) mostraron no estar colocalizadas con el RV. Sin embargo, el análisis cuantitativo de correlación usando el algoritmo de Mander`s. mostró alta frecuencia de colocalización de todas las proteínas. El porcentaje de superposición de señales dada por la intensidad del RV TRUYO con la proteína es indicado por M1 y el porcentaje de superposición de la señal de cada proteína con el RV es indicado por M2. El porcentaje de superposición tanto de M1 como de M2 fue mayor a 0,7, indicando colocalización del RV y estas proteínas. Las proteínas presentaron una fuerte colocalización con la señal para el virus, en orden descendente fueron Hsc70 (0,97), β 3 (0,88), Hsp60 (0,87), PDI (0,86), Hsp90 (0,81), Hsp70 y β 1 (0,76) (Fig. 8B). Estos resultados muestran que las proteínas analizadas participan durante la fase de unión del RV TRUYO en las células MES-OV en diferentes grados. Aunque la colocalización no muestra interacción directa de las proteínas, este ensayo junto con los ensayos de unión apoya la idea que las proteínas pueden agregarse y participar en diferentes eventos durante la entrada del RV.

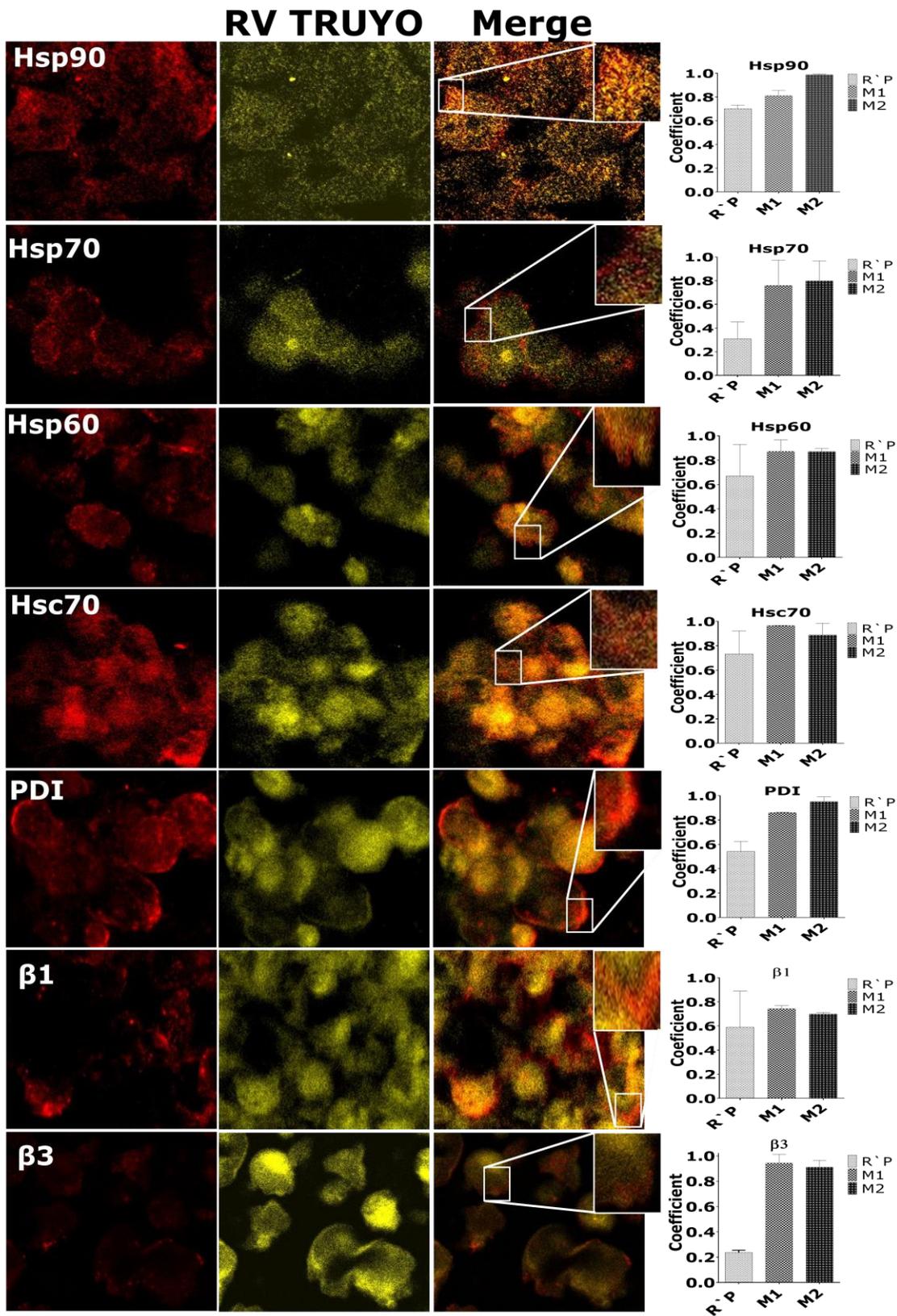


Fig. 8 Localización de la particular víra y las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI, Hsc70, β 1, β 3 en la membrana de células MES-OV. Imágenes representativas de microscopía confocal. Células MES-OV fueron inoculadas con RV TRUYO MOI de 3 e incubadas a 37°C y luego fueron fijadas con PFA (4%). Las células fueron evaluadas para la presencia de Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI, β 1 and β 3. Se usó 0,02 μ g/ml de anticuerpo monoclonal contra cada proteína. Los antígenos de RV fueron detectados usando sueros hiperinmunes contra proteínas estructurales. Como anticuerpo secundario se usó anti-conejo Alexa flúor 555. El análisis fue realizado usando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de solapamiento de Mander's. Las imágenes fueron adquiridas usando Microscopio Confocal Laser Scanning (Olympus FV1000) con objetivo de 60x/1.42 oil PlanApo N. Las imágenes fueron analizadas con el software Fiji. Los resultados son de tres experimentos independientes

El RV TRUYO entra a las células MES-OV por la vía endocítica. Para determinar si el rotavirus TRUYO utiliza la vía endocítica para infectar, se utilizó microscopia confocal para evidenciar si el virus colocaliza con marcadores de endosoma temprano (Rab5) y endosoma tardío (Rab7). Para esto, las células MES-OV fueron inoculadas con MOI de 2 e incubadas a 37 °C por los tiempos indicados y evaluadas para la presencia de Rab5 y Rab7 por fluorescencia (Fig. 9A). Se detectó que 5 minutos después de la infección la proteína Rab5 se expresaba y colocaliza con el RV TRUYO ($r=0,53$), esta señal incrementó a los 10 m post infección (m.p.i), en donde se detectó mayor colocalización ($r=0,68$) y a los 20 m.p.i la intensidad de la señal y la colocalización de rab5 y el RV TRUYO disminuyo ($r=0,47$). Para conocer si el RV TRUYO sigue la ruta de endosoma tardío, se evaluó la expresión de Rab7 y CD63, sin embargo, no se detectó señal hasta los 80 m.p.i (no mostrado). Estos resultados indican que el RV TRUYO usa la vía endocítica. Sin embargo, no se puede determinar que ruta endocítica sigue. Para determinar si durante la infección se forman estructuras celulares compatibles con endosoma evaluamos las estructuras celulares de MES-OV infectadas con TLPs de RV TRUYO (MOI de 1) 2 y 20 m.p.i mediante uso de microscopia electrónica de barrido. En la membrana celular se observaron estructuras compatibles con macropinosoma temprano (Fig. 9B). En conjunto estos resultados sugieren que el RV TRUYO entra a la célula por endocitosis relacionada con macropinosomas y regulada por Rab5.

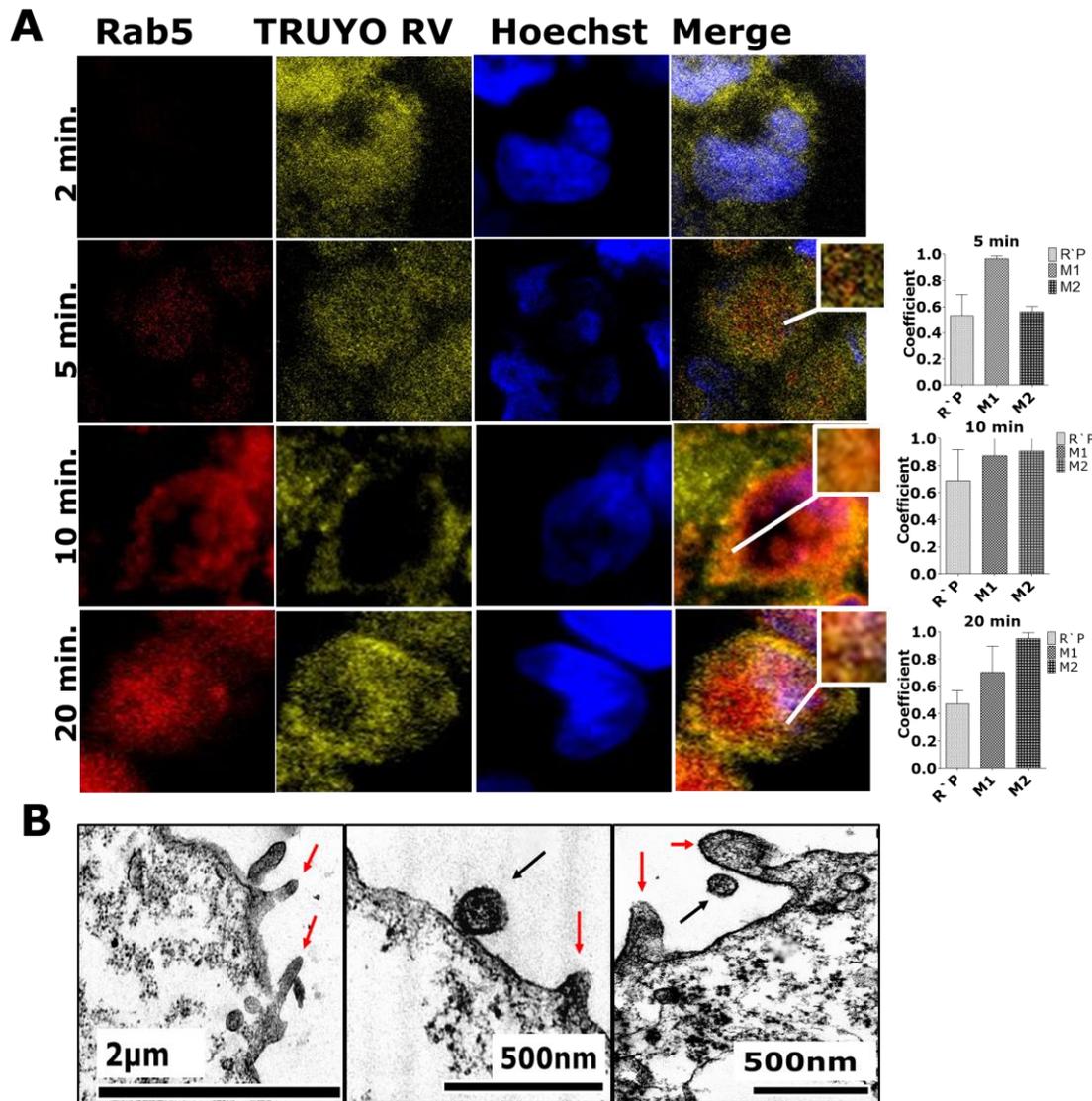


Fig. 9 El rotavirus TRUYO usa la vía endocítica para la entrada. A. Imágenes representativas de microscopía confocal. Células MES-OV fueron inoculadas con RV TRUYO MOI de 3 e incubadas a 37°C y luego fueron fijadas con PFA (4%) en los tiempos indicados. Las células fueron evaluadas para la presencia de Rab5 y antígenos de RV. Se usó 0,02µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-Rab5-Alexa flúor 647. Los antígenos de RV fueron detectados usando sueros hiperinmunes contra proteínas estructurales. Como anticuerpo secundario se usó anti-conejo Alexa flúor 555. El análisis fue realizado usando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de sobrelapamiento de Mander's. Las imágenes fueron adquiridas usando Microscopio Confocal Laser Scanning (Olympus FV1000) con objetivo de 60x/1.42 oil PlanApo N. Las imágenes fueron analizadas con el software Fiji. Los resultados son de tres experimentos independientes. B. Microscopía electrónica de transmisión de células MES-OV infectadas con RV TRUYO MOI de 2. Imágenes representativas mostrando estructuras similares a lamelopodios para "engolfamiento" del RV TRUYO. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1400 plus A 80 KV) y no representan eventos continuos. Flechas rojas indican las estructuras similares a lamelopodios y las flechas Negras muestran el virus. Las imágenes fueron analizadas con el software Fiji.

La infección por el rotavirus TRUYO genera efectos citotóxicos en las células MES-OV. Para evaluar si el RV TRUYO genera efectos citotóxicos, la integridad de membrana citoplasmática y actividad metabólica fue evaluada por inoculación de rotavirus TRUYO (MOI 1, 5 y 10) en la línea celular MES-OV. La actividad metabólica de células infectadas fue evaluada con el ensayo de MTT. Se encontró disminución de la actividad metabólica del 50% para MOI 1, 5 y 10 de infección comparada con células no infectadas ($p > 0,001$). Los resultados muestran reducción en la actividad enzimática del 25- al 30% desde las 6 h.p.i. y entre 45-50% a las 12 h.p.i (Fig. 10A), sugiriendo que el rotavirus TRUYO induce un efecto citotóxico. Los resultados muestran incremento en la pérdida de la integridad de la membrana a través de los tiempos examinados. La evaluación de las células 12.h.p.i mostró disminución en la integridad de la membrana celular entre 40- 50% (Fig. 10B). La evaluación de la integridad de la membrana celular y nuclear usando el agente intercalante 7-ADD muestra que el 20% de células MES OV presentan alteración de la permeabilidad celular (Fig. 10C). En la misma muestra usada para evaluar la presencia de PS, se evaluó la actividad metabólica de las células mediante el uso de citocalceina. Los resultados muestran la presencia de los tres grupos celulares; células con presencia de PS, células con permeabilidad de la membrana (7 AAD) y células vivas con actividad metabólica (Fig. 10D). Mediante tinción de Hoechst se encontró condensación de DNA en células MES-OV infectadas con MOI de 1 12 h.p.i (Fig. 6 E). Mediante tinción con Hoechst y TUNEL se encontró fragmentación de DNA 12 h.p.i. en el $47.4\% \pm 2,2$ de células MES-OV inoculadas con MOI de 1 (Fig. 10F). Durante la activación de señales de muerte, proteasas suicidas fragmentan a PARP1 en dos segmentos específicos, uno de 89 KDa que es liberado al citoplasma y un fragmento de 24 KDa que se une irreversiblemente a segmentos de DNA rotos e inhibe las enzimas de reparación de DNA induciendo de esta forma a la muerte celular (159, 160). Mediante el uso de anticuerpo específico contra la fracción fragmentada de PARP-1 se realizó citometría de flujo a células infectadas con rotavirus TRUYO (MOI 1). Los resultados muestran que 12 h.p.i el rotavirus y XIAP se encontraron reguladas negativamente. Su expresión fue 21%, 8% y 50% respectivamente. Así mismo la familia de proteínas IGFBP, las cuales están relacionadas con supervivencia se encontraron disminuidas. Como control de muerte se usó células tratadas con 200uM de Cisplatino por 6 h. (Fig. 10H y 10I). En conjunto los datos muestran que 12 h.p.i con RV TRUYO las células MES-OV muestran señales de muerte induce expresión de PARP-1 fragmentada en el 33,4% de las células. (Fig. 10G). Debido que las células MES-OV mostraron expresar señales de muerte 12.h.p.i con RV TRUYO, posteriormente examinamos el efecto del RV en la expresión de proteínas relacionadas con apoptosis usando un arreglo de proteínas (Fig. 10H y 10I). se encontraron cambios en la expresión de marcadores relacionados con apoptosis en células inoculadas con RV TRUYO MOI

comparada con células no tratadas. Las proteínas que fueron reguladas positivamente (verde) y que mostraron diferencias significativas en la expresión 12 h.p.i comparado con lo expresado en células no infectadas fueron la caspasa 3 y la caspasa 8, con un aumento de 51% y 42% ($p < 0,0001$) respectivamente. Otras proteínas promueve celular encontradas reguladas de forma positiva fueron Fas (32%), FasL (18%), HSP60 (11%) ($p < 0,001$). Las proteínas anti apoptóticas, Bcl-2, Bcl-w celular y supervivencia.

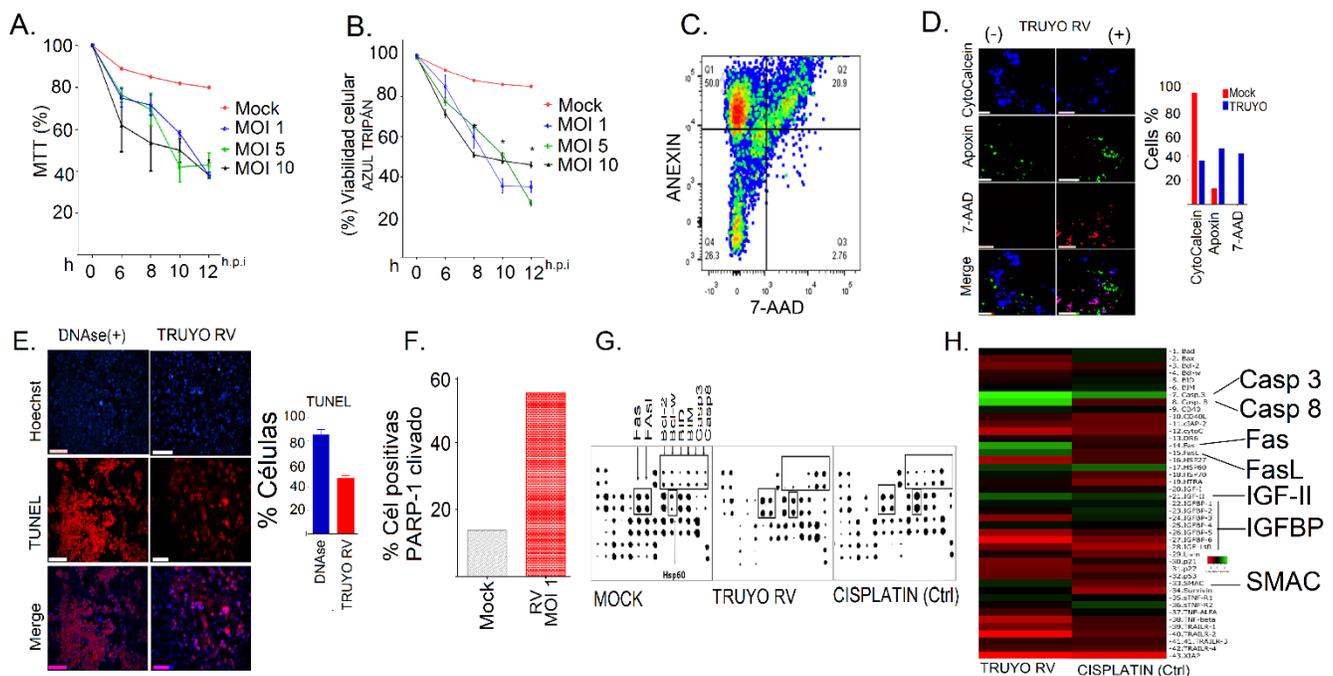


Fig. 10 El rotavirus TRUYO genera efectos citotóxicos en las células MES-OV. **A.** Células MES-OV fueron inoculadas con RV TRUYO MOI de 1, 5 y 10, luego de 12 h.p.i la viabilidad fue evaluada por el ensayo de MTT. Y en **B** Azul tripán. **C.** Perfiles de citometría de flujo de células MES-OV inoculadas con RV TRUYO (MOI 1) luego de 12 h.p.i, donde se evaluó la presencia de fosfatidilserina y permeabilidad celular usando anexina V y 7-AAD. Se muestra células MES-OV sin infección y células infectadas. **D.** Células MES-OV inoculadas con RV TRUYO (MOI 1) y evaluadas para detectar la actividad metabólica usando citocalceina como sustrato, fosfatidilserina usando Apoptina y permeabilidad de la membrana usando 7-AAD como se describe en materiales y métodos. **E.** Ensayo de TUNEL. **F.** Cuantificación de PARP-1 Fragmentada por citometría de flujo. Se evaluó cambios en la expresión de proteínas de muerte usando el kit “Human antibody array”. Como control de muerte celular se usó cisplatino 200 μ M. **G.** Imágenes representativas del “dot” en cada tratamiento. Los cambios en la expresión son indicados con flechas. ($p > 0,001$). **H.** Mapa de calor donde se representa la expresión relativa de las proteínas comparada con el control (células sin tratamiento). El color verde representa las proteínas con el nivel más alto de expresión y en rojo las proteínas con el nivel más bajo de expresión comparada con células no infectadas.

4.2.4 Discusión

El RV silvestre infecta de manera natural células polarizadas como las microvellosidades intestinales (31). Este tropismo es mediado por receptores de membrana que median la unión y entrada del rotavirus durante las primeras fases de infección, lo cual ha sido demostrado por la capacidad de replicación de rotavirus transfretado mediante liposomas en células resistentes a la infección (células L y Hep2) (161-164). Uno de los aspectos importantes durante el diseño y desarrollo de un VO es el conocimiento de los receptores celulares, dado que permite conocer qué tumores pueden ser susceptibles a la infección. Previamente hemos mostrado que RV adaptados en líneas celulares tumorales muestran mayor capacidad de infectar e inducir muerte de células tumorales cuando fue comparado con sus especies parentales (37). En el presente estudio las células MES-OV obtenidas a partir del líquido ascítico de una paciente con cáncer de ovario (ATCC) fueron usadas para evaluar la capacidad oncolítica de uno de los RV adaptados en nuestro laboratorio (RV TRUYO). Los resultados obtenidos indican que esta línea tumoral es susceptible a la infección por el rotavirus TRUYO dado que se encontró incrementó en la concentración de antígenos de RV a través de las horas post infección, tanto en el sobrenadante como en el lisado celular y por la síntesis de proteínas virales no-estructurales. Esto sugiere que el rotavirus infecta las células MES-OV, sintetiza proteínas necesarias para desencadenar señales que permitan la replicación viral, ensamblaje de nuevos viriones y activación de vías de señalización de muerte celular. Las proteínas no estructurales de rotavirus han sido relacionadas con diversos efectos en la célula, incluyendo detención de la respuesta antiviral (165, 166) e inducción de muerte (101, 102). Usando diferentes MOI de infección (1,5 y 10) se encontró que el ciclo de replicación de este virus se encuentra entre 8 y 10 horas, aunque a las 6 h.p. i. se evidenció la liberación de partículas virales capaces de infectar nuevas células MES-OV. La concentración de antígeno en el lisado celular con MOI de 1, MOI de 5 y MOI de 10 fueron similares a las 6 h.p.i, pero entre 10 y 12 h.p.i se evidencio diferencias significativas entre el MOI de 1 y el de 10 ($p < 0,001$). indicando que la concentración de virus inoculado está relacionada con la cantidad de antígenos virales producidos en las h.p.i evaluadas. Carreño-Torres, JJ et al (2010), demostraron en células MA104 infectadas con RRV (RV Rhesus) que el número y tamaño del viroplasma, estructuras que dirigen el empaquetamiento y replicación del genoma viral dentro de cápsides intermedias, aumenta de acuerdo al MOI y que entre mayor sea el MOI la formación del viroplasma es más temprana (167).

A bajas temperaturas el RV es capaz de unirse a las proteínas receptoras (34). Usando esta característica, se demostró que el RV TRUYO se une a células integra o membranas citoplasmáticas

enriquecidas de la línea celular MES-OV. La disolución de lípidos y posterior precipitación de complejos unidos a RV permitió identificar en los precipitados la presencia de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI y $\beta 1$. El uso por separado de fracciones F(ab)² de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas, mostró disminución en la unión y en la infección del rotavirus TRUYO. Estos resultados indican que Hsp90, Hsp70, Hsp60 Hsc70 y PDI de la superficie de las células MES-OV son importantes para la adhesión y entrada del RV TRUYO. El rotavirus TRUYO no tuvo la capacidad de infectar células CHO, las cuales previamente se han reportado tener una susceptibilidad limitada a la infección por especies de RV silvestre (145). Esto muestra que el RV adaptado necesita de moléculas receptoras en la membrana de las células tumorales, las cuales permiten su adhesión y entrada. Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario la identificación del mecanismo de interacción de las proteínas receptoras y/o correceptoras del RV y si otras biomoléculas participan como receptoras de este virus, dado que ningún anticuerpo contra las proteínas evaluadas aquí ni el tratamiento previo con m β CD disminuyen el 100% de la infección.

El uso de las proteínas de choque térmico por el rotavirus TRUYO es de gran importancia en TVO, dado que algunas de las proteínas evaluadas aquí han sido encontradas en la superficie de varios tipos de cáncer incluyendo el cáncer de ovario (168-171). La función de las proteínas de choque térmico en la superficie de células tumorales se ha relacionado con la capacidad de estas proteínas de interactuar con receptores implicados en la respuesta inmunológica, entre ellos, se ha relacionado con receptores Toll -Like (TLR) y células naturales Killer (168, 172). Estas proteínas también han sido encontradas como receptoras de varios virus y bacterias. Por ejemplo, se ha demostrado que el virus del dengue usa las proteínas Hsp90 y Hsp70 como un complejo receptor para la entrada (173). La proteína Hsp70 y Hsp90 β actúan como receptoras del virus de la encefalitis japonesa (174, 175), el virus de Coxsackie A9 (176) y el virus linfotrópico T humano tipo1 (177). Otra proteína chaperona que es usada como receptora por microorganismos es la Hsp60. Se ha demostrado que esta proteína se une a la proteína de adhesión de *Listeria monocytogenes* (LAP) (178), a la proteína de unión a fibronectina de *Staphylococcus aureus* (179) y a la proteína gp41 de del virus de la inmunodeficiencia humana en líneas celulares humanas (180). Varias especies de RV usan las proteínas Hsc70, PDI o integrina $\alpha\beta 3$ $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$ como receptoras (35, 83, 90, 145). Así mismo se ha demostrado que la sobreexpresión de las subunidades αv y $\beta 3$ en células resistentes a la infección (CHO), promueven la infección del rotavirus (35).

Cuando se mezclaron las fracciones F(ab)² de ab contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI y $\beta 3$ se observó un efecto aditivo. Esto indica que estas proteínas participan en la entrada del RV TRUYO de forma independiente o que la ubicación de estas proteínas es cercana dentro de la membrana lipídica. Interesantemente, se ha reportado que algunas proteínas de choque térmico pueden formar complejos funcionales en la membrana de líneas celulares. Por ejemplo se ha encontrado que Hsp90 y Hsp70 forman clústeres con otras proteínas en la membrana (181). Triantafilou K., et al (2001), mostró que después de estimular células con lipopolisacárido (LPS) las proteínas Hsp90 α y Hsp70 forman un clúster heteromérico junto con el receptor de la quimioquina 4 (CXCR4) y el factor 5 de crecimiento/diferenciación (GDF5) (181). Así mismo, Hsp90 y Hsp70 se encontraron asociadas en membranas de células U937 durante la entrada del Virus del Dengue (173). Además de estas proteínas se ha encontrado que Hsp60 precipita junto con la integrina $\alpha 3\beta 1$ durante la infección de *Staphylococcus aureus*, indicando su asociación durante la entrada de este microorganismo (179). En el presente trabajo encontramos que las proteínas Hsps, PDI e integrina $\beta 1$ inmunoprecipitan en complejos no covalentes. En líneas celulares de cáncer de mama también se ha encontrado que la proteína Hsp60 activa la integrina $\beta 1$, posiblemente modulando cambios conformacionales (182). También se ha demostrado, dimerización de Hsc70 y Hsp70 (10) y oligomerización de Hsp70 (183) en membranas artificiales. Aunque la función de las proteínas de choque térmico en la membrana celular aún no se ha aclarado. Esto podría indicar que ellas participan en un mecanismo específico para el reconocimiento de antígenos. Es posible que durante la entrada de RV a las células, las proteínas Hsps y PDI realicen modificaciones conformacionales a proteínas celulares de unión al RV. Las proteínas detectadas como receptoras de RV han sido evaluadas en su gran mayoría mediante ensayos inmunológicos. En este estudio se evaluó la participación de las proteínas usando ensayos de unión y de bloqueo, lo que permite evaluar su participación durante la fase de adhesión y entrada, pero no permite evaluar la función de cada proteína durante la entrada del RV.

El agrupamiento de las proteínas chaperonas e integrinas se ha encontrado en dominios de membrana lipídica resistente a detergentes, en la cual se da una interacción entre lípidos y proteínas (173). La función de las proteínas ubicadas en balsas lipídicas depende en gran parte de la estructura dada por la concentración de colesterol. Estos nanodominios de la membrana son heterogéneos, dinámicos y ricos en colesterol, esfingolípidos y proteínas ancladas a glicofosfatidilinositol (184, 185). La formación y tamaño de clúster de proteínas ha sido directamente relacionada con la concentración de colesterol (186). Adicionalmente se ha encontrado que los microdominios lipídicos juegan un papel importante durante la entrada, replicación y liberación de RV tipo silvestre (152, 187, 188). Así mismo, se ha

reportado que la función de las balsas lipídicas difiere en cada tipo celular debido a la heterogeneidad de lípidos que las componen (154). En este trabajo encontramos disminución de la infección por tratamiento previo de las células con m β CD 10 μ M, indicando que la función de las balsas lipídicas en células MES-OV de cáncer de ovario son importantes para la entrada de RV TRUYO. Esto es acorde con lo reportado por Dou X., et al (2018), quienes encontraron que el colesterol presente en las balsas lipídicas es necesario para la entrada de un RV porcino (153). La evaluación de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70 y PDI en microdominios lipídicos de células MES-OV mostró la asociación de estas proteínas en complejos formados por interacciones no-covalentes. Es probable que la aplicación de la porción F(ab)² contra cada una de ellas genere un efecto inhibitorio en la infección de RV TRUYO por participación de cada proteína, de forma individual, dada la disminución en la infección cuando se bloquean en forma separada. Además, también encontramos un alto índice de colocalización de cada una de estas proteínas con el RV, lo que apoya a la idea de un clúster funcional. Sin embargo, encontramos que la integrina β 3 no colocaliza con el virus lo de acuerdo con el índice de correlación de Pearson, lo que concuerda con el ensayo de bloqueo, en donde la porción F(ab)² del ab contra esta proteína no bloqueo la infección y con el ensayo de unión en donde no encontramos unión usando membranas de células. Pero, el análisis del índice de solapamiento de Mander's mostró colocalización cuando se evaluaron las células que expresaban β 3. Teniendo en cuenta lo anterior y dado que en modelos celulares se ha demostrado que algunas de estas proteínas forman clústeres funcionales en microdominios lipídicos, nosotros hipotetizamos que las proteínas aquí descritas participan de forma coordinada o forman un clúster funcional en microdominios lipídicos para permitir la internalización del virus y que la función de estas proteínas en la membrana celular determina la susceptibilidad de las células MES-OV a la infección.

En este estudio la extracción de colesterol por tratamiento con m β CD 10 mM durante 1 h a 37 °C no genero perdida de la unión de las proteínas Hsp90; Hsp70, Hsp60 y HSc70 a RV TRUYO. Al contrario, la señal de unión fue mayor que cuando no se extrajo el colesterol de las células con m β CD. Esto es acorde con un estudio realizado por Dou X., et al 2018, quienes encontraron que la extracción de colesterol no afecta la unión, pero si la entrada de un RV porcino (153). Adicionalmente, el aumento en la señal detectada por fluorescencia, cuando se extrae el colesterol con m β CD ha sido descrito para el estudio de otras proteínas encontradas en balsas lipídicas. Un estudio de agregación de la proteína Sintaxina 1 (proteína de unión a membrana), demostró que la disposición y clusterización de las proteínas depende del tiempo y concentración de m β CD. Ellos encontraron que dentro de los primeros minutos de tratamiento con m β CD 15 mM se aumentaba la señal de fluorescencia y esta se observaba

más agregada, sugiriendo que la depleción del colesterol permitía mayor acceso del ab. Adicionalmente, un estudio realizado por Zhang M, et al (2018) mostró que en liposomas que contenían 25% de colesterol, la proteína Hsp90 presentaba un incremento en el nivel y afinidad de unión comparado con liposomas con 50% de colesterol (186). Nosotros encontramos que la extracción de colesterol no afecta la unión a las proteínas Hsp pero si es un determinante en las fase post-adhesión, dado que el tratamiento con m β CD disminuyo la infección (189). Es probable, que la extracción de colesterol en las condiciones experimentales indicadas en este estudio exponga un mayor segmento de las proteínas al espacio extracelular y el RV tenga mayor interacción con las proteínas. Además, sugiere que la organización estructural de las proteínas dada por el colesterol es necesaria para la interacción entre proteínas celulares y del RV durante la fase de entrada.

Estudios in vitro en células MA104 y CaCo2 y usando diferentes especies de RV han mostrado varias biomoléculas de la membrana celular como receptoras o correceptoras del RV. Entre ellas se encuentran el ácido siálico, gangliósidos, proteínas de choque térmico (Hsc70), PDI, proteínas que estabilizan filamentos de actina (DBN1), integrinas (α 2 β 1, α 4 β 1 α v β 3, α x β 2), proteínas de las uniones estrechas como JAM-A, Occludin y ZO-1 (33, 35, 36, 83, 85, 89, 90). En este estudio el análisis de proteínas de choque térmico, PDI e integrinas en la línea celular tumoral MES-OV mostró que varias proteínas de choque térmico participan durante los primeros pasos de infección. Esto podría indicar requerimientos del RV para la entrada a la célula huésped depende de la especie. Sin embargo, teniendo en cuenta lo anterior es posible que para la entrada del RV (y otros microorganismos) a las células se requiere de un estímulo inicial de unión que desencadene una cascada de señalización ya sea por activación o reclutamiento de proteínas a microdominios lipídicos en la membrana donde se podrían modificar o generar cambios conformacionales de las proteínas allí ubicadas. Posterior a estas modificaciones, las proteínas podrían actuar como receptoras y de esta forma permitir la entrada del RV. Una vez el RV se encuentre unido, por ejemplo, a ácido siálico (190, 191), deben participar proteínas que permitan la entrada del RV. En el paso post-adhesión se han descrito varias integrinas, la proteína de choque térmico Hsc70 (34), proteínas de unión intercelular (89), que interactúan ya sea con la proteína VP4 o VP8 del virus. Esta diversidad de interacción entre proteínas de membrana celular con los RV podría indicar que las moléculas de unión o correceptoras de este virus comparten una misma característica, ya sea funcional o estructural.

Se han descrito diferentes vías de entrada para los RV silvestres (75, 93). En este trabajo se encontró colocalización con Rab5, indicando un mecanismo de entrada dependiente de GTPasas, sin embargo,

no se detectó (hasta los 80 m) la expresión de Rab7 la cual ha sido relacionada con endosoma tardío u otras estructuras de la vía endocítica. Esto indica que el RV TRUYO sigue una ruta diferente a la reportada para algunas especies de RV silvestres o que la formación del endosoma tardío se da después de los 80 m Sin embargo, para otras especies se ha reportado que la colocación de Rab7 se da desde los 80 minutos (149). Adicionalmente se ha encontrado que la proteína Rab5 precipita con VP4 de lisados de células transfectadas con el cDNA de VP4, durante los eventos tempranos de infección (192). Adicionalmente se ha descrito que la unión entre VP4 y RV induce cambios conformacionales de los receptores (30). Mediante TEM se detectaron cambios sugestivos de formación lamelopodias. Es posible que la interacción de RV TRUYO con los receptores de la membrana, induzcan cambios en la estructura de esta que permitan el “engolfamiento” del virus. Estas estructuras similares a lamelopodios han sido previamente reportadas en células BSC-1 (monkey, African green, kidney) (30). Es probable que la extracción de colesterol con m β CD en células MES-OV bloquee la formación de estas estructuras (lamelopodias) y por lo tanto no se permita la internalización del RV TRUYO, como se ha mostrado para la penetración del HIV-1 a células endoteliales microvasculares del cerebro (193). Estos resultados sugieren que la ruta endocítica mediada por macropinosoma juega un papel importante en la internalización del RV TRUYO, sin embargo, se requieren más estudios que permitan caracterizar esta ruta de entrada.

El RV TRUYO induce muerte entre el 40-50% de las células MES-OV 12h.p.i. La alteración en la permeabilidad mostrado por disminución en la exclusión de azul tripán y permeabilidad al agente intercalante 7 ADD muestra que este virus induce muerte por lisis celular a las 12 h.p i. EL 33 % de las células mostraron activar PARP y el 23% externalización de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular. Adicionalmente se mostró que este virus induce fragmentación de DNA 12.h.p.i. Esto sugiere que es posible la activación de diferentes programas de muerte celular. En este trabajo no sincronizamos las células MES-OV previa a la infección. Es posible que los mecanismos de muerte se presenten de forma heterogénea y que dependa de la etapa del ciclo celular. Se ha demostrado que la infección con RV tipo silvestre (CRW8) induce externalización de la PS en líneas celulares MA104 y HT29, pero no en células CaCo-2. Indicando que el mecanismo de muerte celular inducido por el RV depende de las características de las células. La infección con RRV induce fragmentación de DNA solo en células terminalmente diferenciadas Caco-2 (194). EL RRV induce fragmentación del DNA y pérdida del potencial de membrana y liberación de citocromo c de la mitocondria.

4.2.5 Conclusión

En este estudio se muestra un RV adaptado con capacidad de infectar y replicarse en una línea celular de cáncer de ovario que expresa las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI, β 1 y β 3 en su membrana. Estas proteínas se ubican en balsas lipídicas y actúan como receptoras o correceptoras de este RV. El RV TRUYO usa la vía endocítica a través mediado por la proteína Rab5, la cual está asociada a endosomas temprano y de acuerdo con las estructuras observadas en TEM sugerimos que este virus puede entrar a través de macropinosoma. Por último, el RV TRUYO induce señales de muerte. Esta caracterización inicial nos permite proponer al RV TRUYO como un potencial VO para cáncer de ovario. Sin embargo, es necesario evaluar esta capacidad oncolítica en muestras de pacientes en un modelo “*ex vivo*” o en modelos animales.

5. CAPÍTULO 4. RESULTADOS EN MUESTRAS OBTENIDAS DE PACIENTES

5.1 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE ROTAVIRUS TRUYO EN CULTIVOS PRIMARIOS OBTENIDOS DE CÁNCER DE OVARIO.

5.1.1 Contextualización

Aproximadamente 295.414 mujeres son diagnosticadas con cáncer de ovario (CO) y 184.799 mueren cada año de acuerdo con las estadísticas de Globocan (C56) (1). La supervivencia es del 90% para las pacientes que son diagnosticadas en estados tempranos de la enfermedad. Sin embargo, debido a la sintomatología inespecífica, el 80% de las pacientes son diagnosticadas en estadios III y IV lo que lleva a una supervivencia de menos del 60 % a 5 años (195). La terapia actual para pacientes con CO avanzado involucra cirugía citoreductiva y quimioterapia basada en platinos (196). Se ha observado que entre el 40 al 60% de las pacientes tienen una respuesta clínica completa a la quimioterapia de primera línea, el 50% de las pacientes recaen dentro de los 5 años y el 10 al 15 % de las pacientes tratadas en estados avanzados presentan una remisión a largo termino (197). Por lo anterior, se han venido desarrollado nuevas terapias biológicas para el tratamiento del CO, que incluyen inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, terapia génica usando transgenes con capacidad citotóxica y anti angiogénica y terapia basada en virus (197-202).

El cáncer de ovario es considerado actualmente como una variedad de tumores que involucran el ovario (110, 203, 204). Ellos pueden ser clasificados en tres grandes grupos de acuerdo con el origen celular; epitelial, de célula germinal y tumor de célula estromal especializada. El 90 % de los cánceres de ovario diagnosticados son de origen epitelial (205). La siembra de células en la cavidad intraperitoneal por el líquido ascítico representa la forma más importante de metástasis peritoneal y es la causa de la carcinomatosis (200). La cavidad peritoneal es un compartimento donde se puede permitir la máxima interacción entre agentes terapéuticos y células tumorales, evitando las barreras encontradas por la administración de terapias por el torrente circulatorio. Teniendo en cuenta esto, el CO es una enfermedad candidata para ser tratada mediante la inyección intraperitoneal de diversos agentes terapéuticos incluyendo los virus oncolíticos. Previamente hemos mostrado que el rotavirus adaptado TRUYO infecta e induce muerte de una línea celular de carcinoma de ovario humano (MES-OV). Varias proteínas e la membrana celular participan durante la infección de este virus. Entre ellas, varias proteínas de choque térmico, PDI y algunas integrinas que se ubican en la superficie de la membrana de estas células y actúan como receptores del virus.

Las proteínas de choque térmico participan en múltiples procesos celulares normales (206). Se han encontrado sobre expresadas en múltiples tipos de cáncer y se ha encontrado que le confieren la capacidad de adaptación a la célula tumoral frente a varias condiciones de estrés en el microambiente tumoral (13, 207). Además, su sobreexpresión en tumor y en suero de pacientes con cáncer se han asociado a un pobre pronóstico en supervivencia (208, 209). En CO se ha encontrado aumento en la expresión de las proteínas Hsp90 (210, 211), Hsp27 (211, 212) y Hsp70 (211, 213), Hsp60 (214, 215), Hsp65 (215). Su sobreexpresión en el tejido tumoral y la presencia de anticuerpos en suero de pacientes con CO las hace llamativas como blanco terapéutico (216, 217). A pesar de los estudios anteriores, la sobreexpresión de estas proteínas en la superficie de la membrana celular en tejido tumoral de cáncer de ovario ha sido poco estudiadas, sin embargo, teniendo en cuenta que en otros tejidos se han encontrado sobre expresadas en la superficie celular y que el rotavirus TRUYO usa algunas de estas proteínas durante las primeras fases de infección, nuestro interés es evaluar si este virus infecta células obtenidas de tumor de ovario en un modelo ex vivo. Si es así, este virus podría ser usado como un potencial virus oncolítico en este tipo de cáncer. Otras de las proteínas que usa el rotavirus durante la infección son las integrinas (35, 36, 83, 145). Estas proteínas son receptores heterodiméricos de la superficie celular que tiene un papel importante durante la carcinogénesis (218). En cáncer de ovario se ha encontrado cambios en la expresión de estas proteínas y se han asociado a invasión, metástasis y proliferación (219-225). Basados en estas observaciones, es probable que el RV TRUYO infecte las células tumorales de cáncer de ovario. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue evaluar si el rotavirus TRUYO tenía la capacidad de infectar, e inducir muerte de células obtenidas fragmentos tumorales obtenidos de pacientes de cáncer de ovario. Esto permitirá avanzar en el conocimiento del potencial oncolítico de este rotavirus adaptado.

5.1.2 Materiales y métodos

5.2.2.1 Establecimiento de cultivos primarios.

El uso de las muestras extraídas por actos quirúrgicos de las pacientes con Cáncer de ovario fue aprobado por el comité de ética de la Sociedad de cirugía del Hospital San José y el comité de ética de la Fundación Santa Fe Bogotá S.C (Colombia). Posterior a la firma del consentimiento informado, se tomó un fragmento tumoral de la masa quirúrgica extraída en cirugía citoreductiva de cada paciente con cáncer de ovario. Para el análisis de todos los ensayos del presente estudio se incluyeron diez muestras. El segmento tumoral para disgregar las células fue elegido con ayuda de un MD patólogo. El material

fue transportado al laboratorio de acuerdo con las normas internacionales para transporte de sustancias biológicas en medio RPMI a temperatura ambiente en un transcurso no mayor a dos horas. Posteriormente, en cabina de flujo laminar, el fragmento tumoral fue lavado varias veces con PBS hasta retirar la mayor cantidad de sangre. Luego se cortó en pequeños trozos de aproximadamente 3 a 4 mm³ y se lavó 3 veces con PBS para retirar la sangre. Los segmentos fueron puestos en vaso de precipitado con solución enzimática conteniendo Dispasa II de Life technologies® (1,4 U/ml) y se realizó agitación mecánica con barra magnética de 10mm a 37°C durante 20 minutos. La solución resultante fue transferida a tubos de 15ml con medio DMEM y centrifugada a 600 x g por 5 minutos. Este procedimiento se repitió varias veces de acuerdo con el número de fragmentos. El precipitado obtenido fue evaluado para viabilidad celular usando azul tripán. Las células fueron cultivadas en medio Mc Coy 5A (Gibco®) suplementado con 20% de SFB a 37°C con 5% CO₂. Las células fueron usadas en pasajes del 1 al 3 máximo y para los ensayos se usaron células en monocapa con confluencia entre el 70 al 80%. La figura 11 muestra protocolo general del procedimiento para aislar y evaluar la capacidad oncolítica en cultivos primarios.

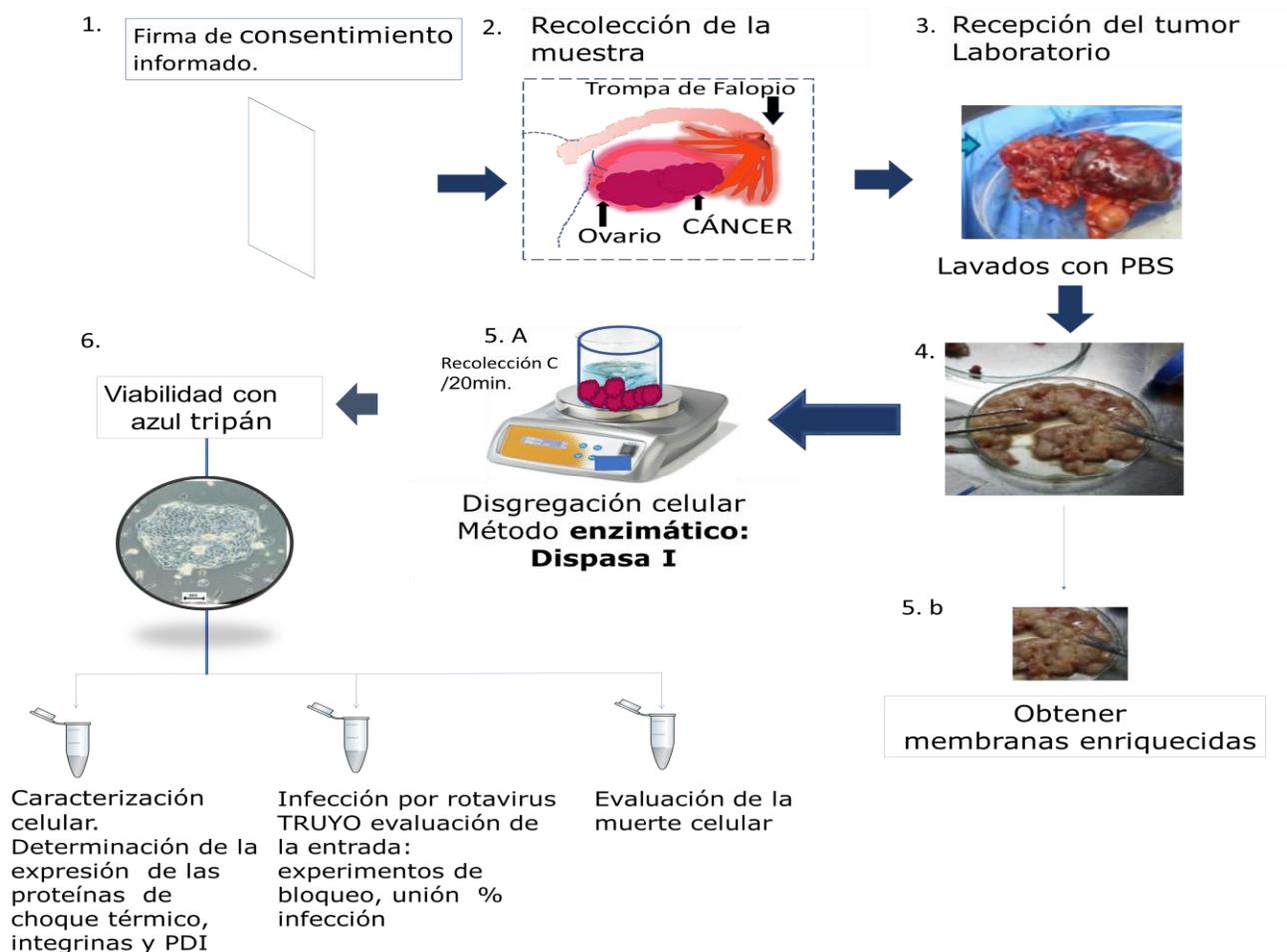


Fig. 11. Procedimiento general para la evaluación del potencial oncolítico del rotavirus TRUYO en cultivos primarios obtenidos de fragmentos de tumor de pacientes con cáncer de ovario.

Anticuerpos y reactivos

Anticuerpos policlonales primarios (pAbs) contra proteínas humanas: HSP 90 α/β (N-17; sc-1055), Hsp70 (K-20; sc-1060), Hsp 60 (N-20; sc-1052), Hsc 70 (K-19-, sc-1059), Hsp 40 (N-19; sc-1801), PDI (E-20; sc-17222), anti-integrina β 1 (L-16; sc-9936), anti-integrina β 2 (N-19; sc-6624), anti-integrina β 3 (sc-8626:), anticuerpo secundario conjugado-HRP anti cabra IgGs (sc-2020), anticuerpo secundario conjugado-HRP anti-conejo IgGs -FITC (sc-2359), anticuerpo secundario conjugado-FITC IgG (sc-2348), anticuerpo secundario conjugado-PE anti-cabra IgG (sc-3747), anticuerpo secundario conjugado-PE anti-conejo IgG-PE (sc-3739) fueron adquiridos a Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA). Anticuerpo anti-Vimentina (EPR3776: Alexa Fluor® 594) (ab154207). Histostain-Plus IHC Kit, (Thermo Fisher Scientific). Proteína A-Agarosa (5 μ l:100 μ l vol/vol; Bio- Rad®, 90-180 μ m), Click-iT®

TUNEL Alexa Fluor® (C10247; INVITROGEN), Medio Mc Coy 5A (Gibco®), kit “TACS MTT Assays” de Trevigen, Inc, Human apoptosis antibody array de Abcam® (ab134001; Cambridge, MA).

Propagación del rotavirus.

La obtención del rotavirus TRUYO proveído por el Dr. Carlos Arturo Guerrero fue detallada previamente (37). El RV TRUYO fue propagado, purificado usando CsCl y cuantificado como fue previamente descrito (37). La cuantificación de rotavirus se realizó como esta descrito previamente (226). Un stock de virus fue preparado para todos los ensayos.

Infección viral de cultivos primarios.

Para evaluar la infección en los cultivos primarios, 8 x 10⁶ células obtenidas de pacientes fueron adheridas a cajas de 12 pozos, lavadas con PBS e inoculadas rotavirus TRUYO MOI de 0,8 previamente activado con tripsina 1 µg/ml. Luego de esto las células fueron incubadas 1 hora a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, se lavaron con PBS y se agregó medio Mc Coy 5 A, se incubo por 12 horas a 37°C con 5% de CO. Las células infectadas fueron detectadas mediante inmunocitoquímica. Como controles se usaron células a las cuales no se les inoculo rotavirus TRUYO.

Ensayo de infección de tejido.

Se evaluó la infección en tejido sin disgregar, mediante fragmentación del tejido tumoral en segmentos de 3mm² aproximadamente, posterior a esto se colocaron en cajas de Petri estéril y se inyectó con aguja de insulina en un solo punto 1 x 10⁶ UFF/ml de rotavirus TRUYO. Se agregó medio Mc coy 5 A sin SFB. Se incubo durante 24 horas a 37°C. Para detección de antígenos de rotavirus, los segmentos fueron embebidos en parafina, luego se realizaron cortes histológicos de 0,4 µm con micrótomo, posterior a la deshidratación con alcohol absoluto al 95%, 80% y 70% se realizó la detección siguiendo el mismo protocolo de inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica.

La evaluación de la infección de los cultivos primarios en el ensayo de bloqueo se realizó mediante inmunohistoquímica (IHC) usando protocolos estándar de fijación de las células. La presencia de antígenos virales fue evaluada con sueros hiperinmunes contra RV generados en cabra (dilución 1:2000 vol./vol.). Como anticuerpo secundario se usó anticuerpo anti-cabra conjugado-HRP (sc-2020). La reacción fue revelada usando el kit Histostain-Plus IHC Kit, rabbit. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

Ensayo de bloqueo

Para evaluar si las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1 y β 3 participan en la infección del RV TRUYO en estas células, se sembraron 5 x 10⁵ células de cultivos primarios de cinco pacientes en cajas de 96 pozos, posterior a la adherencia, las células fueron lavadas con PBS y se añadió por separado 0,01mg/ml y 0,02mg/ml de la porción F(ab)[']2 del anticuerpo contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI y β 3. Para el bloqueo de la proteína β 1 se usó el ab anti β 1 (sc-9936). Se incubó a 4°C durante 45 minutos. Posteriormente se lavó con PBS, se agregó medio McCoy 5A y se incubó a 4°C por 15 minutos. Luego se inoculó con RV TRUYO MOI de 0,8 y se incubó 45 min a 4°C, se llevó a incubo durante 12 h a 37°C, 5% de CO₂. El porcentaje de infección fue evaluado mediante IHC. Como control de negativo se usaron células sin infectar. Para conocer el porcentaje de células infectadas, las células positivas para el antígeno de RV fueron contadas usando el microscopio de luz por dos observadores de forma independiente y en ciego. Los cálculos fueron realizados respecto al control de células infectadas y sin bloqueo y se expresaron como el porcentaje de infección respecto al control sin previa incubación con la porción F(ab)[']2.

Citometría de flujo.

Para evaluar la presencia de antígenos virales y antígenos celulares se realizó citometría de flujo siguiendo protocolos estándares. Para caracterizar el fenotipo de las células obtenidas en cultivo primario, se realizó citometría de flujo y epi-inmunofluorescencia. La cuantificación fue realizada por citometría de flujo usando anticuerpos contra CK8/18 conjugado con Alexa fluor 488(abcam) el cual define epitelial y vimentina para definir fenotipo mesenquimal usando el anticuerpo anti-Vimentina conjugado con Alexa Fluor® 594 (ab154207). El porcentaje de células infectadas fue evaluado mediante detección de antígenos de rotavirus en cada cultivo primario posterior a la infección. Para esto las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol puro por 1h. a -20°C. Luego de bloquear con SFB al 3% se incubaron con sueros hiperinmunes contra proteínas no estructurales y estructurales del RV generado en cabra (dilución 1:2000 vol./vol.) durante 1 h. a 37°C. Como anticuerpo secundario se usó 0,04 μ g/ μ l de ab-anti-cabra conjugado con PE (sc-3747) y se incubó 20 minutos a 37°C. Como control en cada ensayo se usaron células del mismo paciente sin infectar. Para evaluar la permisividad de los cultivos primarios a la infección por el RV TRUYO, evaluamos la presencia de proteínas no estructurales de RV TRUYO. Para esto después de realizar la infección como se indicó arriba, las células fueron evaluadas para la presencia de las proteínas no estructurales del RV (NSP1 a NSP6) usando sueros hiperinmunes contra cada proteína no-estructural generados en conejo. Como anticuerpo secundario se usó 0,04 μ g/ μ l de ab-anti-conejo conjugado con PE (sc-3739).

Para evaluar la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1, β 2 y β 3 en los cultivos primarios obtenidos de cada paciente, 2×10^6 obtenidas en cultivo primario para cada paciente fueron fijadas con paraformaldehído sin metanol al 4%, bloqueadas con SFB al 3% en PBS e incubadas por separado con $0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de los pAbs anti-cabra contra cada proteína: HSP 90 α/β (sc-1055), Hsp70 (sc-1060), Hsp 60 (sc-1052), Hsc 70 (sc-1059), Hsp 40 (sc-1801), PDI (sc-17222), anti-integrina β 1 (sc-9936), anti-integrina β 2 (sc-6624), anti-integrina β 3 (sc-8626:). Como anticuerpo secundario se usó $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ab anti-cabra conjugado con FITC (sc-2348).

Para evaluar la expresión de fosfatidilserina en la membrana y alteración en la permeabilidad en los cultivos primarios obtenidos de pacientes con cáncer de ovario e inoculados con RV TRUYO se usó kit Apoptosis/necrosis ab176749 (abcam®), se siguieron las instrucciones del fabricante. Como control de muerte se usaron células expuestas a 100mM de Doxorubicina por 6 h.

La detección de PARP-1 fragmentada se realizó en el mismo grupo de células en las que se hizo el ensayo de infección. Como anticuerpo primario se usó anticuerpo anti- PARP1 fragmentada (ab2317, Abcam). Como anticuerpo secundario se usó $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de anticuerpo anti-conejo-FITC (sc-2359). En todos los ensayos las muestras fueron analizadas por uso de un citómetro de flujo FACS Canto™ II BD® y software FlowJo_V10®.

Epi-inmunofluorescencia.

La presencia de viriones maduros con capacidad infectante fue evaluada mediante epi-inmunofluorescencia. Para esto los sobrenadantes obtenidos de tres cultivos primarios infectados con rotavirus TRUYO MOI de 0,8, fueron recolectados 12 h.p.i, luego centrifugados a $600 \times g$ para precipitar desechos celulares. Posteriormente, fueron diluidos en un factor de 1/2 con medio Mc Coy 5A sin SFB y se inocularon en un nuevo grupo de células del mismo paciente. El sobrenadante del cultivo primario de infección del paciente 2(p2) fue evaluada en un grupo de células de la línea celular MES-OV. Se usaron sueros sueros hiperinmunes contra rotavirus generados en conejo (dilución 1:2000 vol./vol.). Como ab secundario $0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ab-anti-conejo conjugado con PE (sc-3739). Las imágenes fueron adquiridas en microscopio de fluorescencia Leyca DM 2500 usando el objetivo de 20X y 40X. Como contratinccion de nucleó se agregó 3ng/ml de colorante Hoechst 33342.

Obtención de membranas enriquecidas

Para esto, el tejido tumoral de ocho muestras de pacientes fue congelado a -20°C en un periodo no mayor de 3 horas posterior a la extracción quirúrgica. Luego el tejido fue cortado en bloques de aproximadamente 1cm^2 , descongelado y macerado con ayuda de macerador manual en presencia de buffer hipotónico (5 mM Hepes, pH 7.4, 50 mM sacarosa). Para la obtención de las membranas, se siguió el protocolo descrito por Lin et al 1987 (147).

Ensayo de unión

Se evaluó si las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI $\beta 1$ y $\beta 3$ de las células obtenidas de tumores de pacientes con cáncer de ovario se unen al rotavirus TRUYO durante los primeros eventos de infección usando la célula integra o membranas enriquecidas. Para células integras, 8×10^5 células fueron adheridas en placas de seis pozos, después de lavar con medio RPMI dos veces, se incubaron con lisado de RV TRUYO (MOI de 5 activado con tripsina $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) en RPMI con 1% BSA frío e incubadas por 45 min a 4°C . Después del periodo de incubación el virus no unido fue removido por lavado con PBS frío dos veces. Luego el complejo virus-células fue lisado con buffer RIPA pH 8.0 (150mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris) + inhibidor de proteasas (100mM PMSF, 2mM bestatina, 0,3mM pepstatina A, y 0,3 mM E-64) durante 30 minutos a 37°C . Las células fueron retiradas de la caja con rastrillo y pasadas a un tubo de 1,5ml a 4°C . El porcentaje de virus unido fue calculado usando el ensayo de ELISA de captura como previamente fue descrito (227). Para cada ensayo como control se incubo cada anticuerpo con PBS y en pozo separado se incubo el lisado de célula con PBS. Los datos fueron expresados el porcentaje de unión teniendo en cuenta el inverso del control negativo. Adicionalmente, para evaluar unión de estas proteínas celulares al rotavirus TRUYO, se usaron membranas enriquecidas. Se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, después de haber obtenido las membranas.

ELISA de captura.

Para evaluar la presencia de proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI $\beta 1$ y $\beta 3$ el lisado obtenido del ensayo de unión se realizó el ensayo de ELISA de captura. Se siguió el protocolo previamente descrito (227). Como anticuerpo de captura se usaron sueros hiperinmunes contra antígenos de RV generado en cobayo (dilución 1:1000 vol./vol.), los cuales fueron adheridos a cajas multipozos de poliestireno durante 16 h. a 4°C . Para la detección de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI $\beta 1$ y $\beta 3$ se usaron $0,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ los anticuerpos contra cada una de ellas generado en cabra. Como anticuerpos secundarios se usó $0,13 \mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo anti-cabra-HRP (sc-2020). El ensayo fue revelado utilizando buffer citrato y OPD (o-phenyldiamine dihydrochloride; PIERCE®) y

H2O2. La lectura fue realizada en lector de microplacas (Ultramark microplate reader Modelo 8422, Biorad), a 490nm.

Inmunoprecipitación

Se uso la técnica de co-inmunoprecipitación acoplada a western blot para determinar interacción entre las proteínas del rotavirus y proteínas celulares de la membrana citoplasmática. Aproximadamente, 1.2×10^6 células del cultivo primario obtenido de 4 pacientes fueron lavadas con PBS e inoculadas con rotavirus TRUYO MOI de 5 e incubadas durante 45 m a 4°C. El virus no unido fue retirado mediante dos lavados con PBS. Luego se liso con buffer RIPA + inhibidor de proteasas a 37 °C durante 1h. El lisado fue retirado de la caja mediante raspado con rastrillo y por aspiración con pipeta fue pasado a tubos eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugo a 1000 x g durante 5 minutos y el sobrenadante fue usado para co-inmunoprecipitación. Paralelamente al proceso de lisado celular, las perlas de proteína A-Agarosa (5 µl:100 µl vol./vol.; Bio- Rad®, 90-180 µm), fueron incubadas con sueros hiperinmunes dirigidos contra proteínas estructurales de rotavirus en dilución de 1:20 + 0.1% de ovoalbúmina. Se incubo durante 30 m a temperatura ambiente en agitador tipo vórtex a 700 rpm. Luego se centrifugo 3 veces a 1000 x g por 3 veces con PBS. Posteriormente, las membranas solubilizadas con RIPA se mezclaron con las perlas A-Agarosa y se incubo 1 h a temperatura ambiente en agitación. Los complejos unidos fueron lavados con PBS por 3 veces y precipitados por centrifugación a 1000 x g. Al precipitado obtenido se le adiciono buffer Laemmli y 5% β-mercaptoetanol. Las proteínas fueron desnaturalizadas por incubación de 5 minutos a 100°C en baño de Maria y analizadas por electroforesis en condiciones denaturantes con SDS al 10% (SDS-PAGE). Para la detección de las proteínas celulares se realizó el ensayo de western blot.

Western blot

Las muestras obtenidas de la inmunoprecipitación fueron trasferidas a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) previamente activada con metanol puro por 10 minutos. Para la transferencia se utilizó buffer CAPS 10 mM; pH 11.5 (ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico, 10% de metanol vol./vol.) 10 mM y se realizó usando corriente continua de 20 V por 16 horas. La membrana fue bloqueada con leche descremada 5%, se lavó 1 vez con PBS, se agregó 0,02 µg/µl por separado anticuerpos policlonales contra cada una de las proteínas indicadas (Santa Cruz Biotechnology). La incubación se realizó a 4°C en agitación por 16 h. Después de este paso, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS y se incubo 1 h a 37°C con 0.08 µg/ml de anticuerpo anti-cabra conjugado con HRP (Santa Cruz®). Posteriormente, se lavó 5 veces con PBS. La presencia de proteínas fue evidenciada usando como

sustrato 0.64 mg/ml aminoetilcarbazol (AEC), buffer acetato pH 5.0 y H₂O₂ hidrógeno al 0.4%. La incubación se realizó hasta aparición de las bandas a temperatura ambiente en agitación. Como control se incubó lisado celular con proteína A-agarosa sin anticuerpo contra rotavirus.

Determinación del efecto citotóxico

Para evaluar la eficacia del RV TUYO en inducir la muerte de células obtenidas de tumor de ovario se realizó el ensayo MTT. Para esto, 12 h.p.i de las células con rotavirus TRUYO MOI de 0,8 se realizó el ensayo de usando el kit "TACS MTT Assays" de Trevigen, Inc, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia fue determinada a 650 nm en lector de microplacas (Ultramark; Modelo 8422, Biorad). Los datos son expresados en porcentaje con D.E de viabilidad respecto al control sin infectar.

Detección de fragmentación de DNA por el ensayo de TUNEL

Posterior al ensayo de infección un grupo de células de cada cultivo celular fueron evaluadas para la detección de fragmentación de DNA. Para esto se usó el kit Click-iT® TUNEL Alexa Flúor®. Se siguieron las instrucciones de acuerdo con el fabricante. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio de fluorescencia Leyca 2500 usando objetivo de 20X.

Arreglo de proteínas de apoptosis.

Cambios en la expresión de moléculas relacionadas con apoptosis fueron exploradas en un cultivo primario (código 10) 12.h.p.i con RV TRUYO mediante el uso del kit "Human apoptosis antibody array Abcam® (ab134001). Para esto, las células fueron adheridas en la caja de cultivo T-75, posteriormente se realizó el ensayo de infección como se indicó anteriormente. 12.h.p.i se retiró el sobrenadante y mediante uso de rastrillo se recuperaron las células. La extracción de proteínas y el ensayo se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La señal de quimioluminiscencia fue evaluada con ChemiDoc MP Imaging System, BioRad®. La intensidad de la señal de cada membrana fue medida usando el software Image J® (148). Como control de muerte un grupo de células fueron expuestas a 200µM de cisplatino por 6 horas. Los cambios en la expresión fueron obtenidos de los valores de cada spot de la membrana tratada con respecto al control (células sin tratamiento).

Análisis estadístico.

Se realizo de la misma forma que se describió para el análisis de la línea celular MES-OV.

5.1.3 Resultados

Los cultivos primarios de cáncer de ovario presentan fenotipo epitelial y mesenquimal. Con el objetivo de identificar si el rotavirus TRUYO es un virus candidato para tratamiento de cáncer de ovario, primero establecimos cultivos primarios a partir de fragmentos tumorales obtenidos de pacientes con CO. Para esto, posterior a la firma del consentimiento informado se tomaron fragmentos de tumor de la masa quirúrgica extraída de nueve pacientes. Luego el fragmento fue disgregado mediante método enzimático con Dispasa I y se obtuvo cultivo primario para cada uno. El 80% de las pacientes que participaron en el estudio tenían diagnóstico de cáncer de ovario tipo seroso y el 20 % presentaron diagnóstico de tumor desconocido del ovario. La edad promedio de las pacientes fue de 56.5 años (35-73 años) (Tabla 1). Se obtuvo cultivo primario de las nueve muestras que se disgregaron. Una muestra fue usada para análisis de infección en tejido. Las características de las células fueron monitoreadas al microscopio de luz blanca hasta confluencia del 70 al 80%. En la mayoría de las células obtenidas para cada cultivo primario se observaron células en agrupaciones en forma de adoquín características del cultivo de tejido ovárico (228) (Fig. 12A, Tabla3). Posteriormente, con el objetivo de conocer las características fenotípicas de las células obtenidas se evaluó la expresión de un marcador relacionado con fenotipo mesenquimal mediante el uso de anticuerpo contra vimentina y un marcador relacionado con fenotipo epitelial usando un anticuerpo contra citoqueratina 8/18 (CK8/18) (origen epitelial) (229). Para esto las células fueron sembradas en laminillas inmediatamente después de la disgregación enzimático y se evaluó la presencia de cada marcador mediante epi-inmunofluorescencia. Con el objetivo de cuantificar en los cultivos primarios el porcentaje de células con cada fenotipo, las células fueron despegadas mediante uso de tripsina fijadas e incubadas por separado con anticuerpo primario contra CK8/18 con jugado con Alexa flúor 488 y anticuerpo contra vimentina conjugado con PE. Luego fueron evaluadas por citometría de flujo. Las células obtenidas de todos los pacientes expresaron tanto vimentina como CK8/18 indicando una mezcla poblacional, sin embargo, la mayor población celular obtenida fue la de tipo epitelial.

La expresión de vimentina se observó entre el 2,9% para el paciente con menor expresión (código 2) y 39% para el de mayor expresión (código 5). Mientras el menor porcentaje de células positivas para el marcador CK8/18 fueron las células obtenidas del paciente con código 6 con un 69,3% y el mayor fue para las obtenidas del paciente con código 1 con un 99% (Fig. 12B, Tabla 3). Adicionalmente, los cultivos primarios fueron caracterizados para la expresión del marcador de proliferación celular Ki 67 mediante citometría de flujo. La expresión de ki67 se encontró entre 7.88 % (código 7) y 41.6% (código 9) Tabla 3. (Anexo 2).

Tabla 3 Características clínicas de las pacientes incluidas en el estudio y características fenotípicas de las células.

| Ítem/ Código | EDAD (años) | DX | CK 8/18 (%) | VIMENTINA (%) | Ki 67 (%) |
|-----------------|-------------|------------------------------|----------------|------------------|-----------|
| p1 | 73 | C. SEROSO | 55,5 | 7,6 | 48,6 |
| p2 | 60 | C. SEROSO | 90 | 32,3 | 92,3 |
| p3 | 50 | C. SEROSO | 96 | 14,6 | 33,4 |
| p4 | 47 | Tumor desconocido del ovario | 79 | 16,8 | 24,4 |
| p5 | 51 | C. SEROSO | 84 | 35,7 | 11,8 |
| p6 | 66 | C. SEROSO | 69,3 | 29,2 | 15,5 |
| p7 | 59 | C. SEROSO | 77,4 | 17,8 | 7,88 |
| p8 | 35 | Tumor desconocido del ovario | CK7+ CK20+ | Neg | ND |
| p9 | 60 | C. SEROSO | 72,4 | 39 | 41,6 |
| p10 | 63 | C. SEROSO | ND | ND | ND |

ND: No determinado.

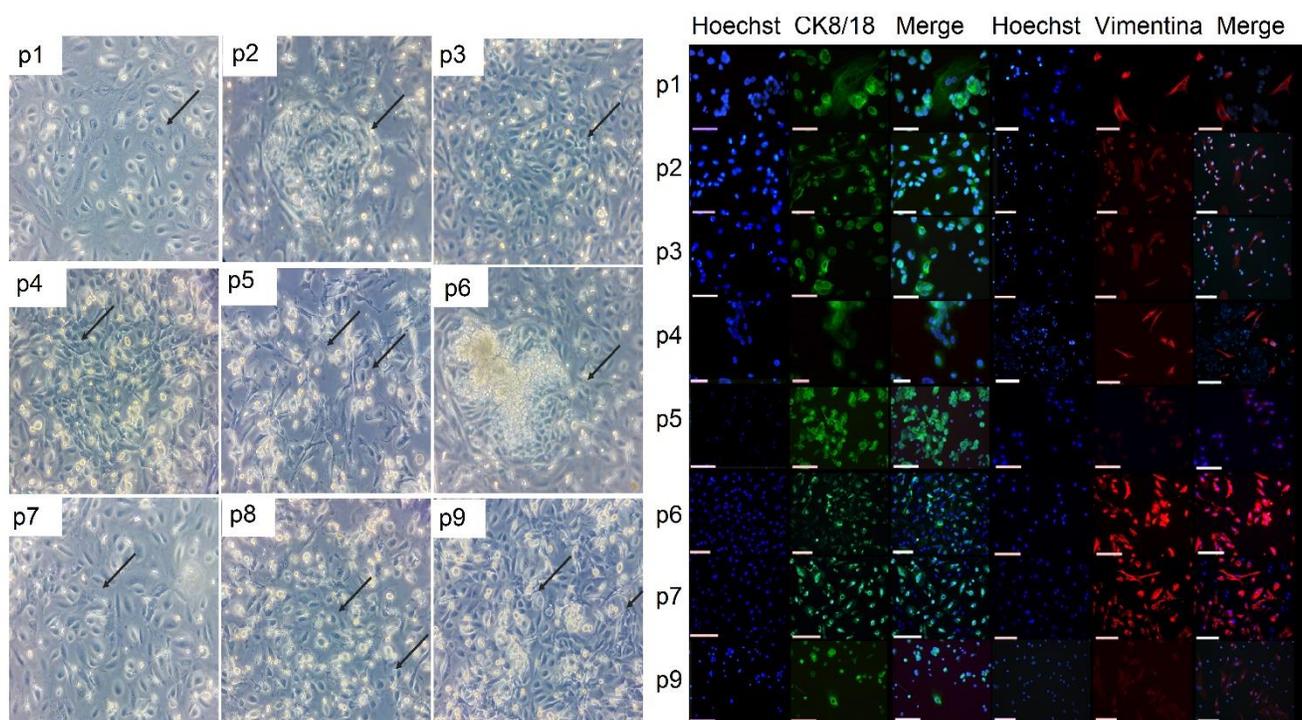


Fig. 12 Expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en cultivos primarios. A.

Imágenes representativas de cultivos primarios. Características de células aisladas de fragmentos tumorales obtenidos de pacientes con cáncer de ovario usando método enzimático. Las células son observadas por microscopio de luz. Las flechas indican la característica en forma de adoquín del tejido ovárico. **B.** Células de los cultivos primarios son cosechadas y fijadas con PFA al 37%, permeabilizadas con saponina al 0,1%. La presencia de marcadores fue evaluada usando anticuerpos contra CK8/18 y Vimentina conjugados con Alexa flúor 488 y ficoeritrina, respectivamente.

Las células obtenidas de tumor de ovario expresan las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, PDI e integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$. Muchos de los VO usados en la clínica presentan un tropismo por las proteínas de superficie expresadas de forma aberrante en las células tumorales (230). Previamente se ha reportado que los rotavirus adaptados en líneas celulares tumorales usan las proteínas de choque térmico, PDI e integrinas durante las primeras fases de infección (37). Con el objetivo de conocer si el CO es candidato para ser evaluado con el rotavirus TRUYO, primero evaluamos si las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, PDI e integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ son expresadas en la superficie de la membrana celular de los cultivos primarios. Las células de cada paciente fueron disgregadas y colocadas a crecer directamente en laminillas para realizar epi-inmunofluorescencia con el objetivo de evidenciar la expresión de las proteínas analizadas en células obtenidas directamente del material disgregado (Anexo 7). La cuantificación de la expresión de estas proteínas en células de los cultivos primarios se realizó por citometría de flujo. Para los dos ensayos se usaron anticuerpos policlonales contra cada proteína.

Como control de célula normal se analizó la expresión en células obtenidas de tejido de ovario normal. Las células obtenidas de los nueve pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario expresaron todas las proteínas en la superficie de la membrana. Las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60 y PDI se expresaron en promedio en el 20% al 25% de las células de los cultivos primarios obtenidos de los nueve pacientes. La integrina $\beta 1$ fue la proteína de mayor expresión con un porcentaje > 70% en el 77% de los cultivos (7/9) mientras que la integrina $\beta 2$ y $\beta 3$ mostraron tener expresión en menor a 40% de las células para todos los cultivos. La proteína Hsp40 se expresó en menos del 12% de la población celular en todos los cultivos. En células obtenidas de ovario normal la expresión de todas las proteínas fue menor al 15% (Fig. 13).

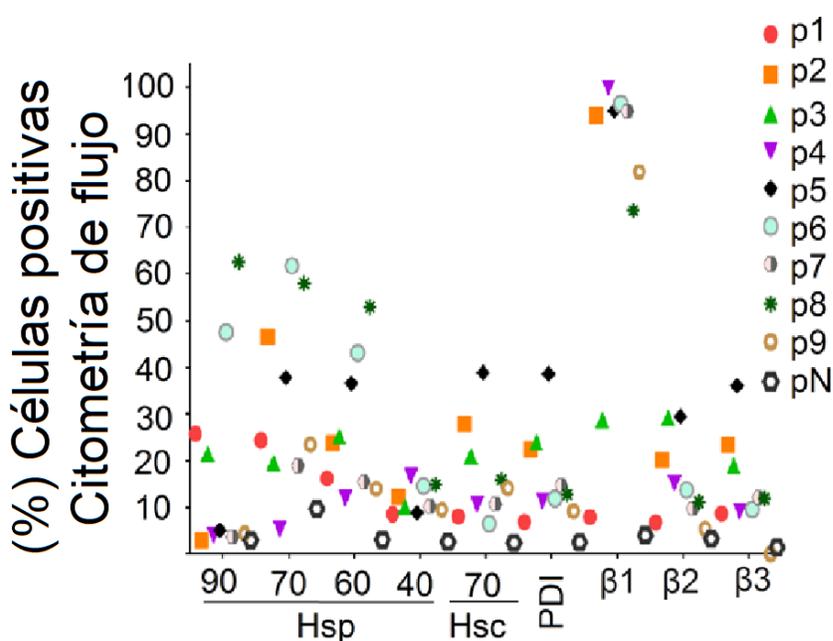


Fig. 13 Expresión de proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70 PDI e integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ en la superficie en cultivos primarios de tumor de ovario. Porcentaje de expresión de las proteínas en cultivos primarios. Los datos son obtenidos por análisis de las células por citometría de flujo. Las células fueron cosechadas usando tripsina, y luego fijadas con PFA sin etanol al 4% y analizadas para la expresión de cada proteína usando anticuerpos como se describió en materiales y métodos.

El RV TRUYO infecta los cultivos primarios obtenidos de tumor de ovario. Previamente se ha mostrado que el rotavirus TRUYO infecta una línea celular de cáncer de ovario que expresa las proteínas de choque térmico evaluadas en este trabajo (37). Dado que la mayoría de los cultivos primarios expresaron las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI y la integrina $\beta 1$ en la superficie celular, evaluamos si los cultivos primarios de los nueve pacientes (p1 a p9) son susceptibles a la infección por el rotavirus TRUYO. Todas las muestras obtenidas de paciente muestran susceptibilidad a la infección. El porcentaje de infección se encontró entre 36% a 80 % 12 h.p.i con MOI de 0.8 (Fig. 14 A). La infección

en cultivo primario obtenido de ovario normal fue del 10%. Para conocer si existen diferencias en la susceptibilidad a la infección de acuerdo con el fenotipo celular evaluamos el porcentaje de infección de acuerdo con la expresión de CK8/ y Vimentina. De las células con fenotipo epitelial (CK8/18+) más del 50% fueron susceptibles a la infección por rotavirus TRUYO (Fig. 14 B y 14 C). Las células con fenotipo mesenquimal presentaron menor infección (Fig. 14C). Esto sugiere que las células epiteliales expresan en mayor porcentaje los receptores del virus, sin embargo, en este trabajo no se dilucidó la relación entre la expresión de vimentina o CK8/18 y la expresión de cada proteína de choque térmico, PDI ni la integrina $\beta 1$. Para determinar si estas células son permisivas a la infección, se evaluó la presencia de proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) del RV en un cultivo primario (código: p2). El porcentaje de células positivas para estos antígenos se encontró mayor al 50%. Siendo el menor para NSP3 (53%) y la más alta NSP5 (59%) (Fig. 14D). Otro de los aspectos importantes en los VO implica la liberación de viriones maduros que infecten células vecinas. Con el objetivo de evaluar si las células de tumor ovario permiten la generación de viriones maduros, usamos el sobrenadante obtenido de tres cultivos primarios (códigos 2, 4 y 7) inoculadas con rotavirus TRUYO para evaluar si contenían viriones con capacidad de infectar nuevas células. Para esto un nuevo grupo de células (5×10^5) de los cultivos primarios 2, 4 y 7 fueron inoculadas con una dilución 1:2 del sobrenadante de los cultivos 2, 4 y 7 previamente inoculados con RV TRUYO. Posteriormente fueron evaluados por epi-inmunofluorescencia. Los resultados muestran que el sobrenadante contiene viriones con capacidad infectante dado que el nuevo grupo de células inoculadas con este sobrenadante son positivas para los antígenos de RV (Fig. 14E). Para evaluar si además de las células aisladas del tumor de ovario el RV TRUYO puede infectar el tejido tumoral sin disgregar, se evaluó la presencia de antígenos de RV en fragmentos tumorales de 3mm x 3mm aproximadamente obtenidos de un paciente (código: p9) al cual se le inyectó RV TRUYO 1×10^6 UFF/ml previamente activado con tripsina $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. En el corte histológicos se observaron antígenos de rotavirus 24.h.p.i, sugiriendo que la matriz extracelular ni las uniones intercelulares interfieren en la infección del rotavirus TRUYO, sin embargo, es necesario realizar ensayos in vivo que demuestren esto. Adicionalmente en este estudio solo se logró evaluar una muestra (Fig. 14F).

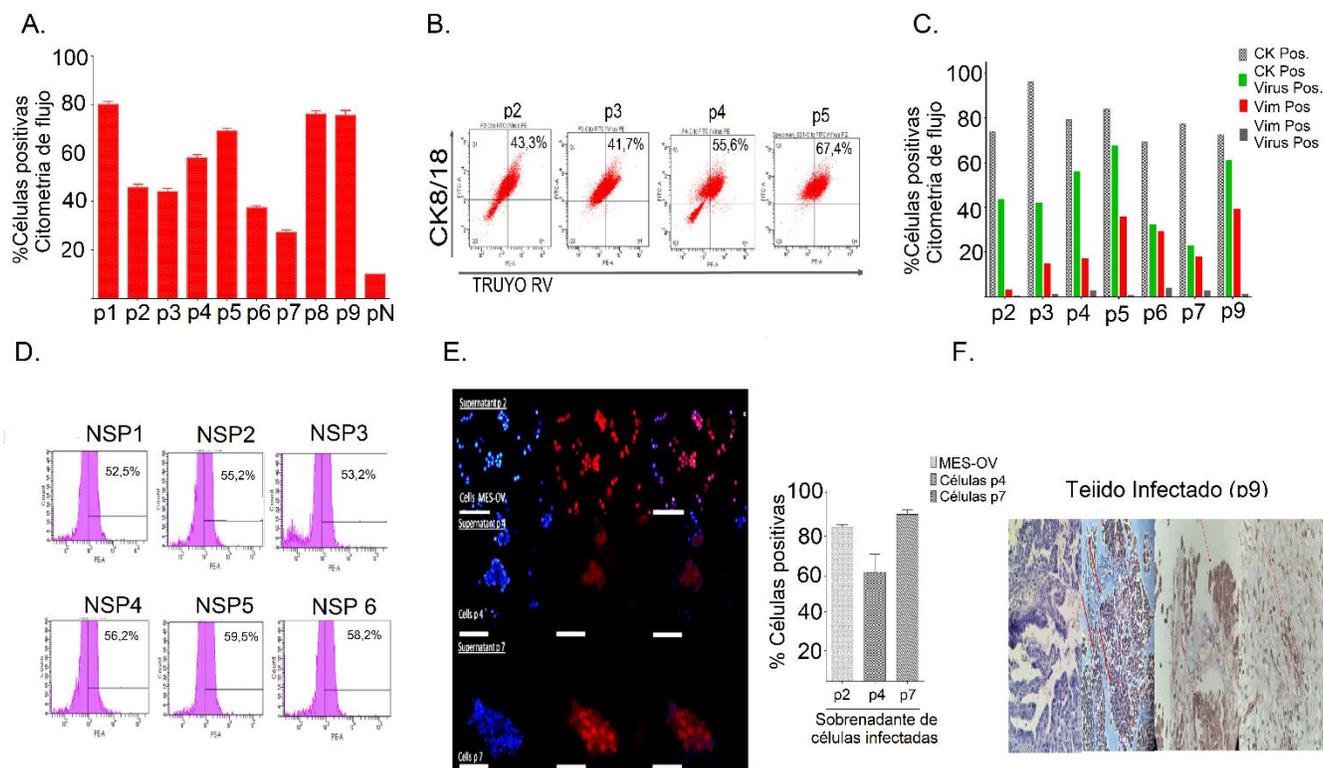


Fig. 14 Los cultivos primarios obtenidos de tumor de ovario son susceptibles a la infección por RV TRUYO. A. La susceptibilidad de los cultivos primarios a la infección por RV TUYO fue evaluada por citometría de flujo usando sueros hiperinmunes contra antígenos de RV producidos en cabra. Como anticuerpo secundario se usó anticuerpo IgG anti-cabra conjugado con-PE. p1 -p9 indica el Código del paciente en el estudio. pN indica las células obtenidas de un ovario normal. **B.** Perfil de citometría de flujo de análisis dual. Se muestra células positivas para CK8/18 y antígenos de rotavirus. Las barras de errores indican la D.E (n=2). **C.** Porcentaje de células positivas para CK8/18 y vimentina. En cada grupo se analiza la positividad para antígenos de RV. **D.** Perfiles de citometría de flujo de un cultivo primario (p2) indicando la presencia de proteínas no estructurales de RV. **E.** Imágenes representativas de fluorescencia, se muestra ensayo de reinfección. Cultivos primarios de tres pacientes fueron inoculadas con RV TRUYO MOI de 1, luego se recolecto el sobrenadante, se centrifugo y el sobrenadante fue usada para inocular un grupo de células nuevo. 12 h.p.i se evaluó la presencia de antígenos de RV usando sueros hiperinmunes contra RV. Se muestra la cuantificación en el diagrama de barras. **F.** Tejido sin disgregar evaluado para la infección por inoculación de RV por inyección. La presencia de los antígenos de RV e evaluó por IHC.

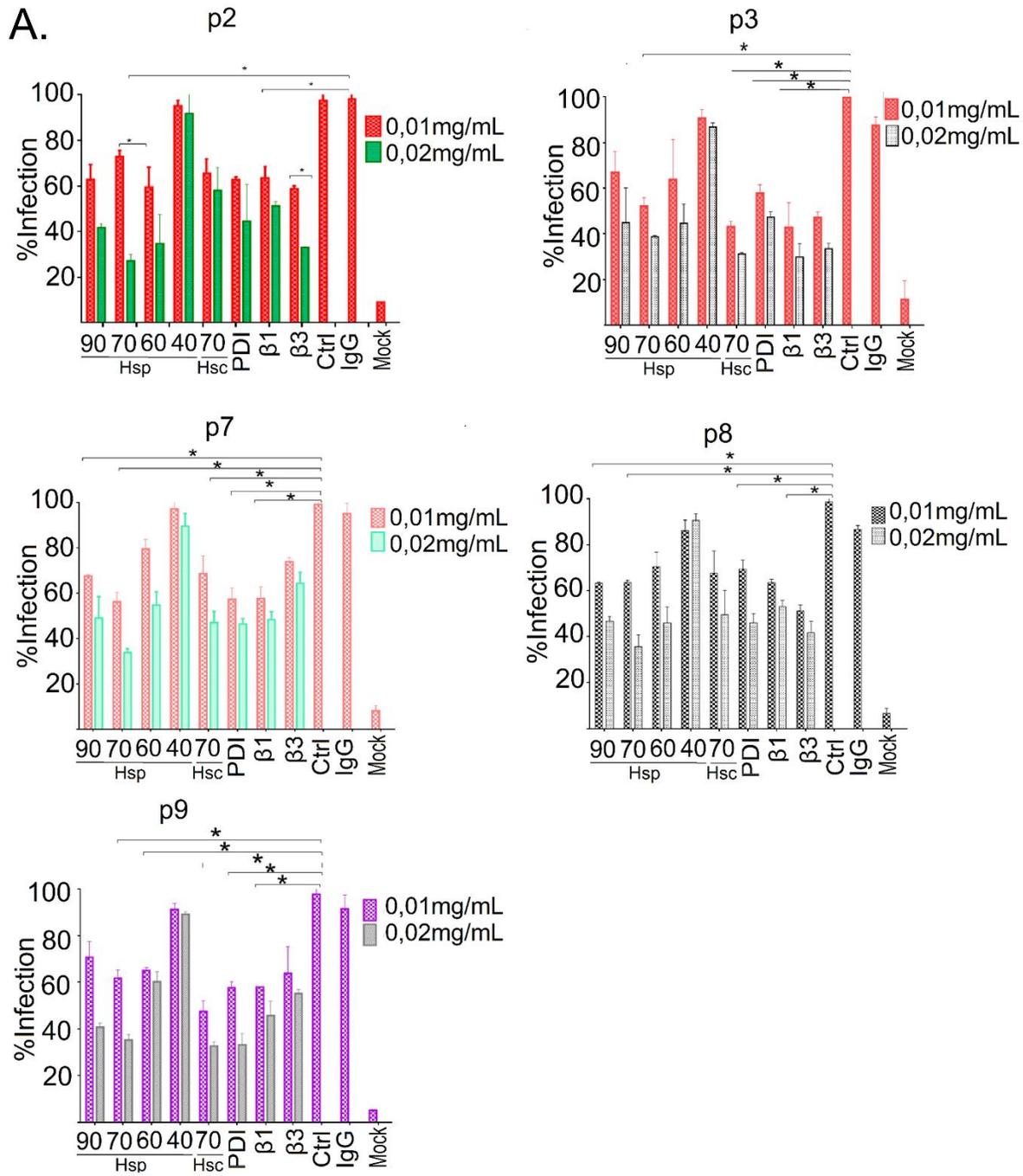
El RV TRUYO usa las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70 y la integrina β 1 en los primeros eventos de la infección. Para conocer si las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI participan durante las primeras etapas de infección de rotavirus TRUYO en las células aisladas de pacientes con cáncer de ovario, se realizó bloqueo de cada proteína con anticuerpos. Para esto las células de cultivos primarios de cinco pacientes fueron pretratadas por separado con sueros hiperinmunes conteniendo la porción F(ab)² de cada anticuerpo, y posteriormente fueron inoculadas

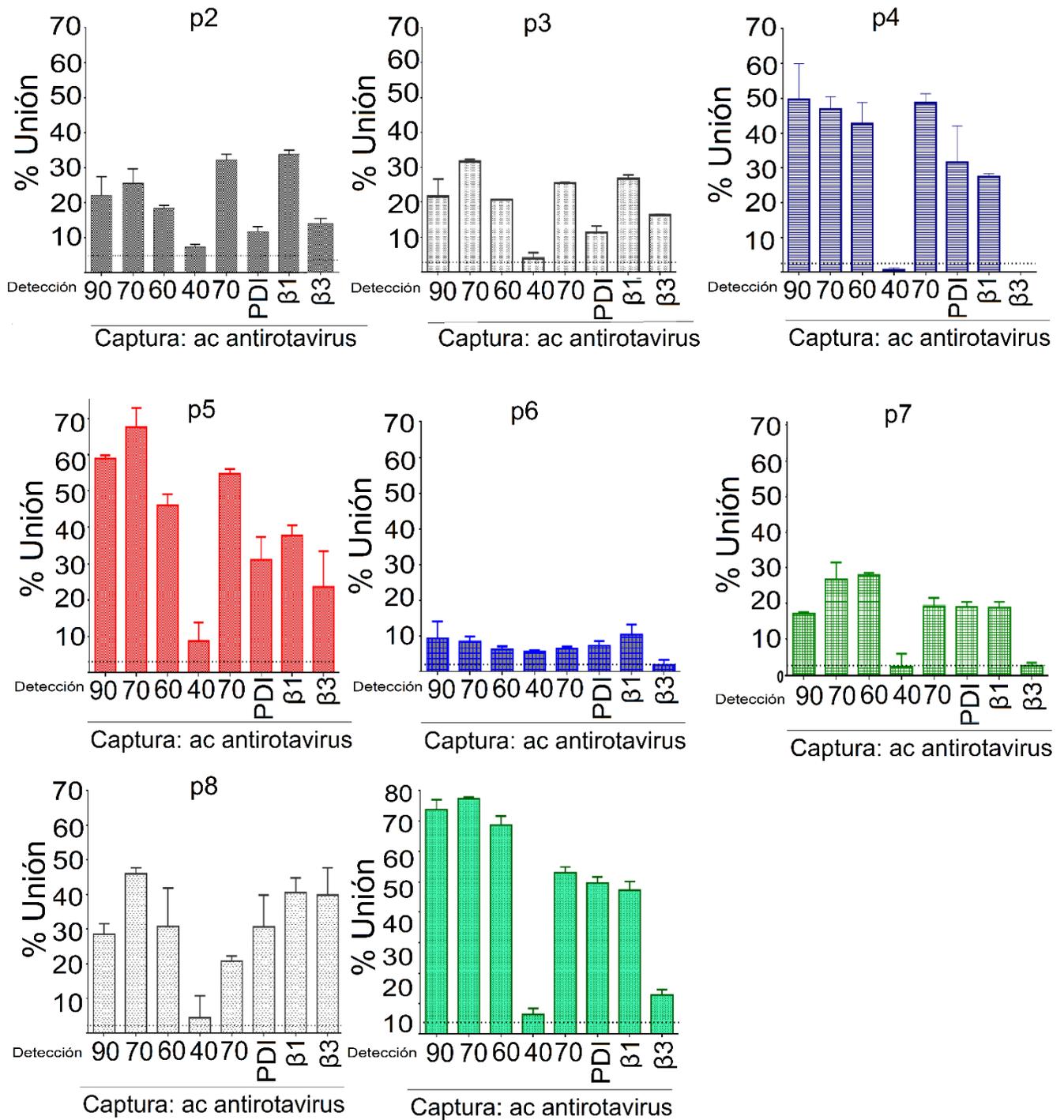
con rotavirus TRUYO a MOI de 0,08. Los resultados muestran variabilidad en cuanto al porcentaje de disminución en la infección respecto a cada proteína bloqueada. Se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre el bloqueo de las proteínas Hsp70, PDI, $\beta 1$ y $\beta 3$ en el 100% (5/5) de los cultivos. El bloqueo de la proteína Hsp90 disminuyó la infección en el 80% (4/5) de los cultivos de los cultivos evaluados ($p < 0,05$) y la proteína Hsc70 en el 60% (3/5) ($p < 0,05$). Como se esperaba el bloqueo de la proteína Hsp40 no inhibió la infección en ninguna muestra analizada, indicando que la disminución en la infección cuando se bloquean las otras proteínas es debido a su bloqueo y no de forma inespecífica por la presencia de la porción F(ab)² en el cultivo, dado que la proteína HSp40 no se expresa en la mayoría de las células de todos los cultivos primarios. Esto indica que todas las proteínas evaluadas pueden participar durante las primeras fases de infección, sin embargo, las proteínas Hsp70, PDI, $\beta 1$ y $\beta 3$ podrían tener un papel importante mayor en estos primeros eventos, dado que su bloqueo fue significativo ($< 0,05$) en todos los cultivos primarios de ovario analizados. Esto muestra, heterogeneidad en cuanto al papel que juegan estas proteínas en la infección dado por las diferencias en la disminución de la infección cuando cada proteína es bloqueada con la porción Fab² (Fig. 15A).

Posteriormente evaluamos mediante ELISA de captura y co-inmunoprecipitación si el RV se une a estas proteínas en las membranas citoplasmática durante la infección y de esta forma disminuye la infección. Células a partir de 8 cultivos primarios (p2-p9) mostraron unión heterogénea en porcentaje con todas las proteínas analizadas (Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI, Hsp60, integrina $\beta 1$ y $\beta 3$) excepto para la proteína Hsp40 (Fig. 15B), Este mismo análisis se confirmó usando co-inmunoprecipitación. Para esto las células previamente adsorbidas con el RV TRUYO a 4°C fueron lisadas con 1% de tritón X-100 A 4°C y precipitados con Proteína A previamente incubada con sueros hiperinmunes contra las proteínas estructurales de RV. Para las cuatro muestras analizadas no se detectaron las mismas proteínas, por ejemplo, para el cultivo primario obtenido del paciente con código 7 se detectó señal para las proteínas Hsp70, Hsc70 y Hsp60, mientras que el análisis de la muestra del paciente código 2 se detectaron las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI. Ninguna de las cuatro muestras mostró unión de RV con las proteínas Hsp40 y $\beta 1$ ni $\beta 2$ (Fig. 15C).

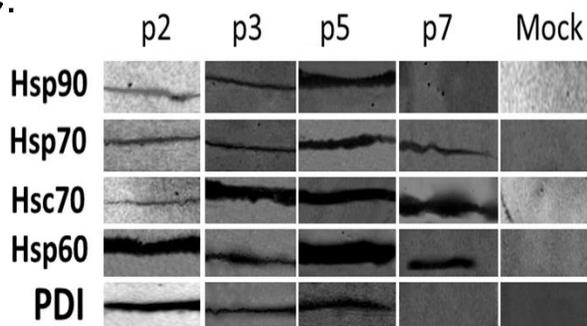
Luego evaluamos si la unión de estas proteínas se mantenía cuando se evaluaba la unión de RV y estas proteínas usando membranas aisladas de tejido tumoral, sin disgregar. Para esto se usaron membranas aisladas de tejido tumoral de muestras de 8 pacientes. Como control, la unión fue inhibida mediante uso de las fracciones F(ab)² de los anticuerpos contra cada proteína. En todas las muestras se detectó unión de todas las proteínas, excepto para la proteína Hsp40. La unión de las proteínas Hsp90, Hsp70,

Hsp60, Hsc70, PDI, $\beta 1$ y $\beta 3$ se encontró entre el 8 al 30%. La unión de la proteína $\beta 1$ se encontró entre el 25% al 35% en las ocho muestras analizadas y la unión de la integrina $\beta 3$ en las ocho muestras fue menor al 25%. El porcentaje de positividad se calculó respecto al control negativo. Los anticuerpos contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, e integrina $\beta 1$ inhibieron la unión de rotavirus TRUYO a las membranas aisladas de tejidos tumorales de ovario (Fig. 15D). En conjunto estos resultados indican que las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI y $\beta 1$ pueden estar interactuando con el rotavirus TRUYO durante la fase adhesión, debido a la unión y a que el bloqueo de estas proteínas disminuye la unión y la infección. Adicionalmente, sugiere que el RV TRUYO puede unirse a estas proteínas de acuerdo con su disposición en la célula dado que, en todas las muestras analizadas, se encontró heterogeneidad en cuanto a las proteínas unidas al RV. Aunque, nosotros no logramos encontrar una relación directa entre el porcentaje de expresión de cada proteína y la disminución en la infección en ninguno de los cultivos primarios.





C.



D.

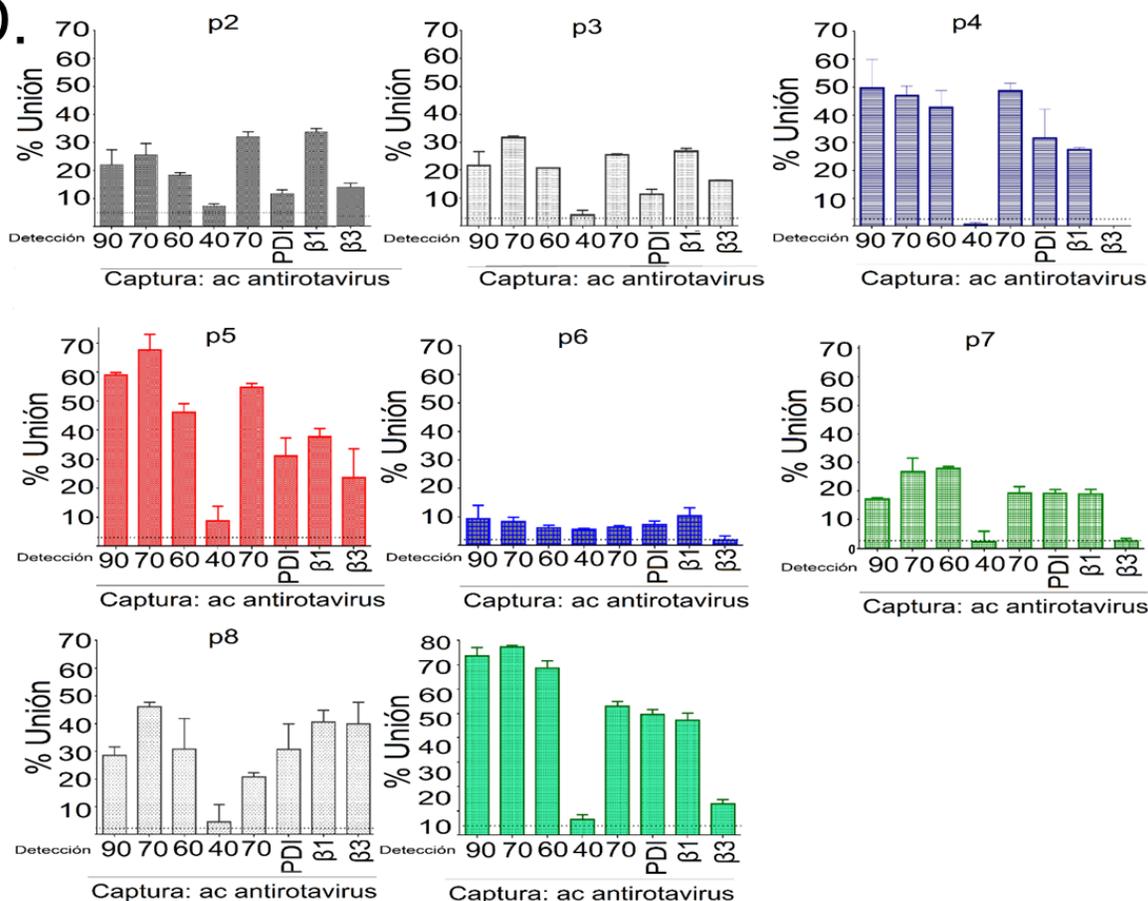


Fig. 15 El RV TRUYO usa las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI e integrina β1 durante los primeros eventos de infección. A. Células de cultivos primarios obtenidos de cinco pacientes (p2, p3, p4, p8 y p9) fueron incubados con la porción F(ab)² del anticuerpo contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI e integrina β1 e incubadas durante 45 min a 37°C, luego de este periodo las células fueron lavadas e incubadas con RPMI 15 min a 37°C. Después de la incubación las células fueron inoculadas con rotavirus TRUYO MOI de 0,8 e incubadas durante 45 min a 37°C, lavadas e incubadas por 12 horas a 37°C, 5% CO₂. Luego se evaluó la infección por inmunohistoquímica como

se describió en materiales y métodos. B. 8×10^5 células fueron inoculadas con rotavirus TRUYO MOI de 5 activado con tripsina $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e incubadas durante 45 minutos a 4°C , luego las células fueron lisadas y evaluadas para unión usando ELISA de captura. Como anticuerpo de captura se usaron sueros hiperinmunes contra las proteínas estructurales del rotavirus generado en cobayo (dilución 1:1000). Como anticuerpos primarios para la detección de las proteínas se usaron anticuerpos policlonales, comerciales generados en cabra (materiales y métodos). C. Co-inmunoprecipitación. Células de cultivos primarios obtenidos de 4 pacientes (p2, p3, p5, p7) fueron incubados con rotavirus TRUYO MOI de 5 activado con tripsina $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ e incubadas durante 45 m a 4°C , lavadas y lisadas. Luego el complejo rotavirus-célula fue precipitado usando perlas de Proteína A previamente incubadas con sueros hiperinmunes contra rotavirus y evaluadas para la presencia de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI e integrina $\beta 1$ mediante western blot. D. Membranas enriquecidas de tejido tumoral de ocho pacientes (p2 -p9) fueron obtenidas y tratadas como en B, la detección de las proteínas fue evaluada usando ELISA de captura. Las barras indican la D.E de dos independientes por triplicado.

La infección de los cultivos primarios con RV TRUYO induce señales de muerte. En células Caco-2, HT-29 MA104, se ha reportado que diferentes especies silvestres de rotavirus inducen muerte por apoptosis y necrosis (97, 231, 232). Para determinar si el rotavirus TRUYO induce muerte en células aisladas se evaluó cambios en la actividad metabólica como medida de la viabilidad celular en los cultivos primarios obtenidos de cada paciente inoculados con rotavirus TRUYO en MOI 0,8. Se encontró disminución en la viabilidad demostrado por cambios en la actividad metabólica entre el 30 a 60% 12.h.p.i (Fig. 16A). También se detectó alteración en la permeabilidad (4% al 38% de células/cultivo) como también aumento en la expresión de PS en la superficie de células en tres cultivos (códigos 3, 8 y 9) 78%, 88% y 96%, respectivamente (Fig. 16B). Uno de los eventos relacionados con muerte celular es el clivaje de PARP1 (159, 160). La evaluación de PARP1 fragmentada en cinco cultivos primarios infectados con rotavirus TRUYO mostró que entre el 20 a 60% de las células expresan este antígeno. Los cinco cultivos primarios evaluados presentan células positivas para antígenos de rotavirus y PARP fragmentada (Fig. 16C). La fragmentación de DNA fue evaluada en dos cultivos primarios inoculados con RV TRUYO. Se encontró que el 40% (código 4) y 70% (código 3) de las células son positivas para TUNEL (Fig. 15D). En estas mismas células se evaluó la presencia de antígenos de rotavirus y se encontró que las células positivas para infección con RV TRUYO también presentaban positividad para TUNEL. Esto sugiere que el RV TRUYO induce un programa de muerte que lleva a fragmentación de DNA 12 h.p.i (Fig. 16D). Dado que estos resultados sugieren un programa de muerte relacionado con apoptosis. Evaluamos cambios en la expresión de 44 proteínas relacionadas con muerte por apoptosis. Para esto usamos células en cultivo primario (código10) en primer pasaje y se inocularon con Rotavirus TRUYO. Se encontró regulación positiva de proteínas relacionadas con apoptosis. Las proteínas que presentaron mayor regulación positiva respecto al control sin infectar fueron la caspasa 3 (42%), Hsp 60(80%), Hsp27 (30%). (Fig. 16E). También se encontró regulación negativa de genes relacionados

con supervivencia, entre ellos IGFBP6 (58%), Livin (40%), XIAP (20%) y relacionados con muerte celular por vía externa TRAIL 2 (40%), TRAIL (35%), TRAIL 4(10%) (Fig. 5F). Estos resultados indican que el rotavirus TRUYO induce muerte relacionada con fragmentación de DNA.

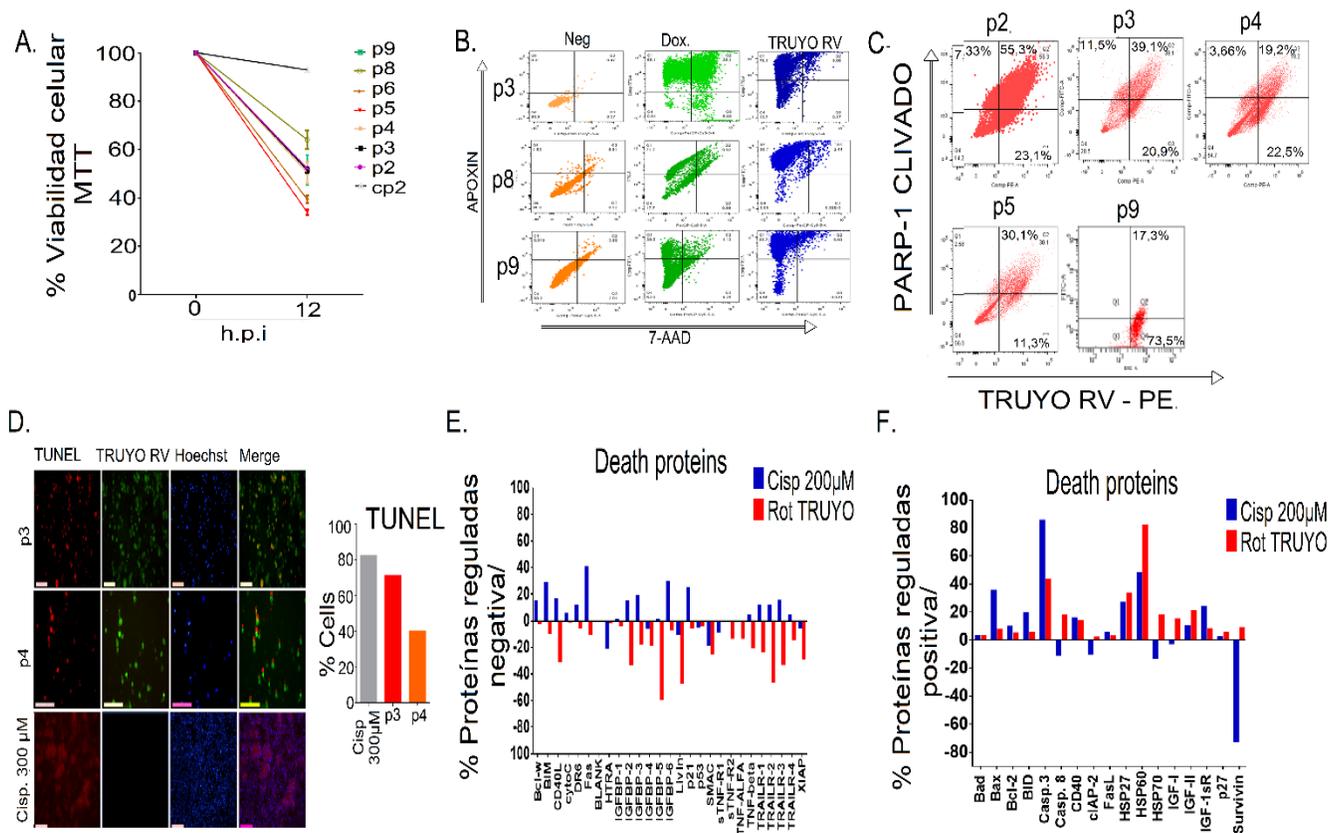


Fig. 16 La muerte celular inducida por el rotavirus TRUYO en cultivos primarios de cáncer de ovario está relacionada con apoptosis. Los cultivos primarios de indicados en cada ensayo fueron inoculados con rotavirus TRUYO MOI de 0,8 e incubados 12h a 37 °C, 5% CO₂. A. Ensayo de MTT 12 h.p.i en siete cultivos primarios. B. Perfiles de citometría de flujo de cultivos tres primarios (p3, p8 y p9) donde se evaluó la expresión de fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana 12 h.p.i. Perfiles de citometría de flujo donde se muestra la presencia de PARP-1 fragmentada y antígenos de rotavirus en cultivos primarios 12 h.p.i. D. La fragmentación del DNA fue evaluada mediante el Ensayo de TUNEL en dos cultivos primarios (p3 y p4). Cambios en la expresión de proteínas relacionadas con muerte celular por apoptosis fue evaluada mediante el uso del kit “*Human apoptosis antibody array Abcam®*”. Se muestra en E. proteínas reguladas negativamente y en F proteínas reguladas positivamente

5.1.4 Discusión.

Los principales problemas para el tratamiento del cáncer de ovario incluyen el diagnóstico en etapas avanzadas y la resistencia a los tratamientos basados en platinos (233). los tratamientos La terapia viral oncolítica es una clase de terapia contra el cáncer que ha ganado importancia en los últimos años, debido no solo a la capacidad lítica que tienen los virus oncolíticos (VO), sino también a su capacidad

de inmunomodular el microambiente tumoral (14). Previamente hemos mostrado que rotavirus adaptados por evolución dirigida en líneas celulares podrían ser usados como virus oncolíticos. El uso de estos rotavirus para el tratamiento de cáncer es atractivo debido a que no se integran en el genoma de la célula huésped (234) y usa amplia gama de receptores para su entrada (234). Nosotros encontramos que el rotavirus TRUYO infecta células obtenidas de tumor maligno de ovario e induce cambios en la expresión de proteínas relacionadas con muerte celular, estos resultados preliminares en la caracterización del rotavirus TRUYO nos permite avanzar en el desarrollo de este virus como agente oncolítico.

Dado que las células obtenidas directamente del tumor presentan mayor heterogeneidad en términos de tipo de celular y de proteínas expresadas en la membrana citoplasmática (235, 236), comparado con línea celular, el modelo usado aquí para evaluar el potencial oncolítico del rotavirus TRUYO nos permite caracterizar el comportamiento de este virus de manera más cercana al componente celular del tumor. La expresión de proteínas de choque térmico de forma aberrante en la célula tumoral ha sido caracterizada en diferentes tipos de tumor (216). En este estudio mostramos que los cultivos primarios obtenidos de tumores de ovario expresan cuatro proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70, Hsc70 y Hsp60), las cuales pueden ser usadas como receptores para el rotavirus, sugiriendo que este virus es candidato para ser usado en el tratamiento de cáncer de ovario. En células infectadas con antígenos de rotavirus encontramos expresión de la proteína PARP-1 fragmentada indicando activación de un programa de muerte celular, que junto con la regulación positiva encontrada de proteínas relacionadas con apoptosis (Fig. 5) refuerza la idea de usar el rotavirus TRUYO como un agente oncolítico. Sin embargo, es necesario ampliar su caracterización con ensayos en modelo animal que permitan evaluar su eficacia y seguridad.

El CO es caracterizado por ser una enfermedad heterogénea en cuanto a las características histológicas de sus subtipos (203). Se cree que el 90% de los CO diagnosticados son de origen epitelial (236). En este estudio la evaluación del fenotipo de las células obtenidas en los cultivos primarios mostró mayor recuperación de células de tipo epitelial. Adicionalmente, el rotavirus TRUYO parece infectar en mayor proporción estas células. En el presente estudio no se estudió la relación entre la presencia de las proteínas usadas como receptoras por el rotavirus TRUYO y la expresión de citoqueratina o vimentina, sin embargo, el análisis de los marcador epitelial y antígenos de rotavirus de forma simultánea nos permite especular que la célula epitelial expresa o por lo menos en mayor cantidad las proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60), la proteína PDI.

No encontramos relación entre el porcentaje de células que expresan las diferentes proteínas analizadas aquí con el porcentaje de infección, pero la disminución en la infección cuando estas proteínas son bloqueadas y la unión encontrada entre rotavirus TRUYO y las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60, PDI e integrina $\beta 1$ y $\beta 3$ mediante ensayo de ELISA y co-inmunoprecipitación nos permite concluir que el rotavirus TRUYO usa estas proteínas para su entrada en las células de los cultivos primarios obtenidos de tumor de ovario. También sugiere, que el rotavirus TRUYO puede usar estas proteínas de forma alternativa y que no es necesario que se encuentren en la membrana citoplasmática todas las proteínas analizadas en este estudio, dado que se encontró heterogeneidad en cuanto a la participación (significancia $p < 0,05$) de las proteínas en el ensayo de infección en los diferentes cultivos primarios. Esto es apoyado además por el hecho que en todos los cultivos primarios se encontró unión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60, PDI e integrina $\beta 1$ y $\beta 3$, y en todos los cultivos primarios se encontró heterogeneidad en cuanto al porcentaje de células positivas para estas proteínas. Por ejemplo, cuando se bloqueó la proteína Hsp90 disminuyó la infección ($p > 0,05$) usando cultivos primarios de los códigos p3, p4, p8 y p9 y disminuyó la unión a rotavirus usando membranas enriquecidas, sin embargo, la expresión de esta proteína solo fue alta en el cultivo primario p8 (62%). Así mismo la proteína Hsp70, mostró significancia ($p > 0,05$) en la disminución de la infección cuando esta es bloqueada usando los mismos cultivos primarios, pero al contrario que la proteína Hsp90, la expresión de esta proteína se encontró entre el 20% al 58% en todos los cultivos excepto en el código p4. Lo cual sugiere que el mecanismo de entrada requiere la presencia de estas proteínas, pero no todas de manera simultánea y es posible que estas proteínas participen en un mismo mecanismo que permite la entrada de este virus.

5.2.4 Conclusión.

Los resultados encontrados en este estudio refuerzan la hipótesis de la formación de clústeres funcionales de algunas de estas proteínas, teniendo en cuenta su participación en la infección en los ensayos de bloque y de unión junto con los de expresión heterogénea en estas proteínas en la membrana celular. Esto es acorde con lo que hemos encontrado previamente en líneas celulares y lo hallado por otros grupos usando otros modelos de infección. Adicionalmente, se muestra el potencial oncolítico del rotavirus TRUYO dado que todos los cultivos primarios obtenidos de tumor fueron infectados en mayor porcentaje comparado con el obtenido de un ovario normal.

6. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se evaluó el potencial oncolítico del rotavirus TRUYO, el cual había sido generado por evolución dirigida.

1. Durante la evolución dirigida el rotavirus TRUYO conservó mayor relación con los rotavirus bovino y simio, dado por su mayor relación filogenética con rotavirus UK y RRV.
2. Mediante análisis de antígenos estructurales y no estructurales en células inoculadas con rotavirus TRUYO, se mostró que las células de ovario, tanto línea celular como cultivos primarios obtenidas de pacientes de ovario e infectados máximo en el pase 3 son susceptibles y permisivas a la infección por este virus.
3. Las células de tumor de ovario se expresan las proteínas de choque térmico, PDI e integrinas en balsas lipídicas.
4. Mediante experimentos de bloqueo y de unión se mostró el papel que tienen las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, la proteína PDI y las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ durante los primeros eventos de la infección del rotavirus TRUYO en células de tumor de ovario. El uso de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, la proteína PDI y las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ durante la entrada es independiente de la concentración de proteína expresada, en términos de proteína evaluada de forma individual.
5. El rotavirus TRUYO en MOI de 0,8 y 1 induce la activación de vías de señalización relacionadas con muerte celular por apoptosis 12h.p.i.
6. La vía de entrada del rotavirus TRUYO involucra la endocitosis, probablemente mediada por macropinosoma.

¿Cuál es el mecanismo de entrada del rotavirus TRUYO?

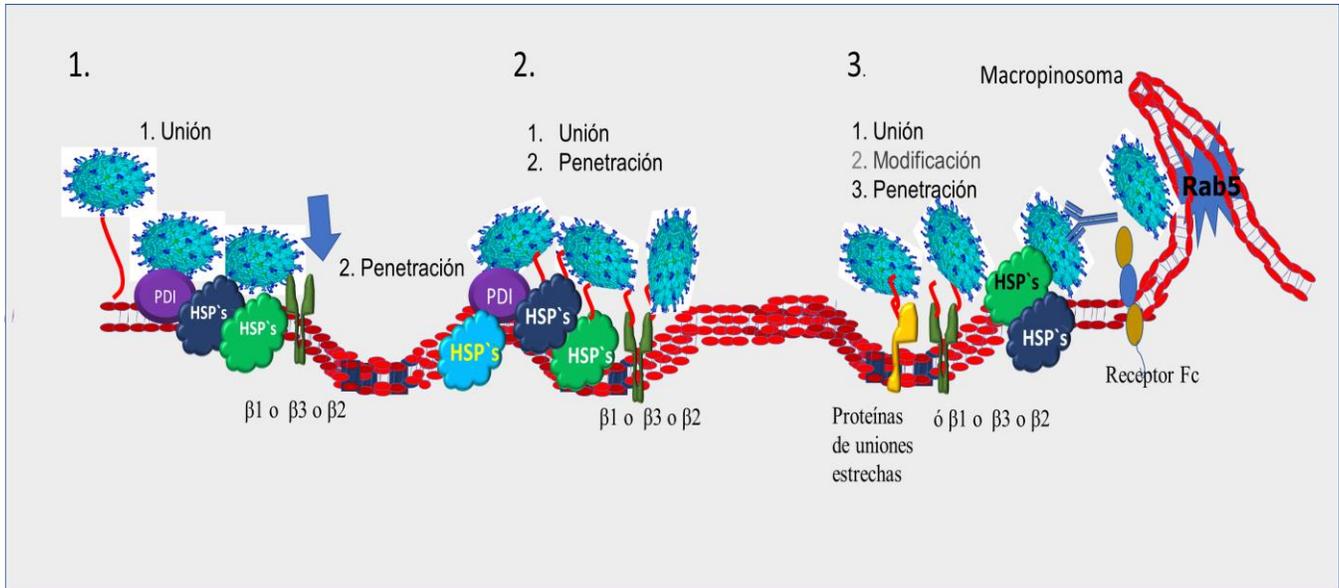


Fig. 17 Propuestas para el mecanismo de entrada del rotavirus TRUYO

Propuesta: El virus necesita interacciones “específicas” con proteínas que cumplan la función de activar una vía de señalización, usando “balsas lipídicas”, que a su vez desencadenen activación de vía endocítica o sean importantes para el remodelamiento del citoesqueleto y de esta forma reclutar proteínas de la vía endocítica

7. RECOMENDACIONES.

Es necesario seguir avanzando en la caracterización de este virus como VO, por lo tanto, se sugiere realizar experimentos in vivo en modelos que validen el tumor de ovario. Así como también es necesario conocer cuál es el mecanismo de entrada del rotavirus TRUYO, ya que estas proteínas participan de forma heterogénea durante la entrada. En el presente trabajo se sugiere que estas proteínas compartan una característica funcional o estructural, o que estas proteínas presentan modificaciones postraduccionales que hacen que el rotavirus TRUYO se una a ellas, una vez se da la unión debe presentarse un mecanismo que permita su internalización. Esto es basado en que es necesario que las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI, β 1 y β 3 estén presentes en la membrana celular (determinado por el experimento de bloqueo), pero independiente del porcentaje de expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI, β 1 y β 3 en los cultivos primarios, el rotavirus TRUYO tiene la capacidad de entrar. Adicionalmente, no se logró establecer una correlación directa entre el porcentaje de expresión de ninguna de las proteínas celulares y el porcentaje de infección.

Por otro lado, es importante seguir evaluando la vía de endocitosis mediada por macropinosoma y evaluar tiempos mayores a 80 minutos para determinar que proteínas colocalizan con este virus en las vesículas endocíticas y si este es el único mecanismo de entrada.

Dado que en los últimos años la TVO ha mostrado ser importante en la inmunomodulación del microambiente tumoral, es importante evaluar marcadores de muerte celular inmunogénica durante la muerte de las células. Esto con el ánimo de mostrar mayor evidencia de este virus como VO.

8. PRODUCTOS ASOCIADOS A LA TESIS.

Dentro del marco del trabajo se realizó una pasantía relacionada con el desarrollo de virus oncolíticos y se asistieron a eventos científicos para divulgación.

8.1 CAPACITACIÓN.

Pasantía internacional en el instituto oncológico catalán (ICO), Barcelona, España en donde se desarrolló trabajo relacionados con virus oncolíticos con el Dr. Ramon Alemany Bonastre.

- Inserción de transposones en el genoma de Adenovirus oncolíticos.
- Generación de una toxina activable por metaloproteasas.

8.2 ASISTENCIA A CONGRESOS.

Internacional

- II International Conference on Cancer Research and Targeted Therapy (CRT2017), MIAMI, USA. 26-28 de septiembre de 2017

Nacionales

- VII Simposio Nacional de Virología y III congreso Latinoamericano de virología. Nov 30- Dic 2 de 2017.
- Primer Simposio de Investigación de Posgrados en Biotecnología UN, Bogotá- 17 al 19 de octubre 2017.

8.3 MANUSCRITO ACEPTADO

"ISOLATION AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF TUMOR CELLS OF PATIENTS WITH DIAGNOSIS OF OVARIAN CANCER" by Gutiérrez-Castañeda Luz Dary; Tovar José David; Quintero Barriga Gloria Cristina; Amezquita Castro Karen Lorena; Guerrero Fonseca Carlos; Sanabria Daniel.

Revista: Journal of Cellular Physiology
Factor de Impacto:4.522. Cuartil: Q2

8.4 MANUSCRITOS SOMETIDOS

- Actividad oncolítica del rotavirus TRUYO en células MES-OV de cáncer de ovario. Fase: Corrección de estilo. Revista de virus (Viruses)
- Actividad oncolítica del rotavirus TRUYO en células en cultivos primarios obtenidos de muestras tumorales de pacientes con cáncer de ovario. (Revista oncología clínica)

9. APORTES AL GRUPO

- Mediante análisis de antígenos estructurales y no estructurales en células inoculadas con rotavirus TRUYO, se mostró que las células de ovario, tanto línea celular como cultivos primarios obtenidas de pacientes de ovario e infectados máximo en el pase 3 son susceptibles y permisivas a la infección por este virus.
- Las células de tumor de ovario se expresan las proteínas de choque térmico, PDI e integrinas en balsas lipídicas.
- Mediante experimentos de bloqueo y de unión se mostró el papel que tienen las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, la proteína PDI y las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ durante los primeros eventos de la infección del rotavirus TRUYO en células de tumor de ovario.
- El uso de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, la proteína PDI y las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ durante la entrada es independiente de la concentración de proteína expresada, en términos de proteína evaluada de forma individual.
- El rotavirus TRUYO en MOI de 0,8 y 1 induce la activación de vías de señalización relacionadas con muerte celular por apoptosis 12h.p.i.
- La vía de entrada del rotavirus TRUYO involucra la endocitosis, probablemente mediada por macropinosoma.
- Durante la evolución dirigida el rotavirus TRUYO conservo mayor relación con los rotavirus bovinos y simio, dado por su mayor relación filogenética con rotavirus UK y RRV.

10. APORTES AL CONOCIMIENTO

- Se muestra que un virus con capacidad de entrar, replicarse, ensamblarse y liberarse en células tumorales obtenidas de pacientes con cáncer de ovario , el cual debe seguirse evaluando en ensayos no-clínicos.
- Se muestra que las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60, PDI integrina β 1 se expresan en la membrana de células de cáncer de ovario.
- Se muestra que las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60, PDI integrina β 1 pueden estar formando complejos en las balsas lipídicas de la membrana citoplasmática en la línea celular MES-OV.
- La “balsa lipídica” es fundamental en la entrada del este RV oncolítico
- Posible mecanismo de entrada del rotavirus adaptado (TRUYO) en células MES-OV es por ruta endocítica mediada por rab5 y macropinosoma.

11. HIPÓTESIS PARA TRABAJOS FUTUROS

El rotavirus oncolítico requiere de proteínas receptoras que cumplan las siguientes funciones:

- Uniones primarias: glicosilaciones
- Cambios conformacionales (que permitan iniciar en desensamblaje del virus e interacciones con proteínas celulares)
- “Chaperoneo” (estabilidad al virus en los cambios conformacionales)
- Generar señales intracelulares que permitan la endocitosis.

GAGCACAAAAAGAAATACAATATGAAATTTACAAAAACGATACCAACATTGAACCA
AAAGAGTCAATATTGAAGAACTGGAAGATATCAAACCGGAAACAAGCGAAGAAGCAGACT
AAGCTATTTAGAATATTTGAACCGAGACAGCTGCCAATTTATAGAGCGAATGGTGAAAAA
GAGTTGCGTAACAGATGGTATTGGAAGTTGAAGAAAAGATACTTTACCAGATGGAGATTAT
GATGTTAGAGAGTATTTTCTAAATTTGTATGATCAGGTTCTTACTGAAAT-----

-----ACCATTGAATAATGATATAATATTCAACTACATTCCTGAAAGGATAAGGAAT
GACGTTAACTATATACTTAAATGGAYAGAAATCTGCCATCAACAGCTAGATATATAAGA
CCTAATTTACTACAAGACAGACTGAATTTGCATGACAATTTTGAATCCTTGTGGGATACR
ATAACAACCTCAAACCTAATTTCTGGCAAGATCGGTAGTACCAGATTTAAAGGAATTAGTY
TCAACCGAAGCGCAAATTCAAAAATGTCRCAAGACTTGCAACTAGAAGCAYTAACAATA
CAGTCAGAAACGCARTTTTTTAACAGGYATA-----

-----AATGGA
CATGTCATTAATCAATTGATGGAAGCTTTAATGCAACTATCACGACAACAGTTTCCAACA
ATGCCCTGTGATTATAAGAGGTCAATCCAGCGTGAATATTATTGCTATCAAATAGGCTT
GGTCAATTAGTTGATTTAACTAGGTTATTAGCTTACAACACTACGAAACACTAATGGCATGT
GTTACGATGAATATGCAACATGTTTCAGACTTTGACAACNGAAAAATTACAGTTAACTTCA
GTTCACTCGTTGTGATGCTNATTTGAAATGCAACNGTTATACCCAGCCCGCAGACATTN
TTTCACTATTANAATGTTAATGTTAATTTTTCATTCAAATTATAATGAAAGGATTAATGAT
GCAGTGGCCATAATAACTGCAGCTAATAGACTAAATTTATATCAGAAAAAGATGAAGGCA
ATAGTTGAAGATTTTTTAAAAAGATTACATATTTTCGATGTAGCTAGAGTTCCAGATGAT
CAAATGTATAGATTAAGGGATAGACTACGACTATTGCCAGTAGAAGTAAGACGNTTGGAT
ATTTTTAATTTGATACTGATGAACATGGATCAGATAGAACNGCNCAGANAAAATTGCG
CANGGTGTTATTATTGCATACCCGATATGCAATTTGGAAAAGAGACGAAATGTATGGCTAC
GTGAATATAGCTAGGAATTTAGATGGGTTCCAGCAAATAAACCTAGAAGAATTGATGAGA
ACAGGCGATTATGCACAGATAACTAACATGCTCTTGAATAACCAACCAGTAGCGTAGTT
GGAGCTCTCCATTTGTTACAGACTCGTCAGTCATATCGTTGATAGCGAAGCTTGACGCT
ACAGTTTTTGCCTAAATAGTTAAATTACGGAAAGTTGATACCTTGAAACCAATATTGTAT
AAAATAAATTCAGATTCGAATGACTTTTATCTAGTTGCCAACTATGATTGGGTGCCTACT
TCAACCACAAAAGTATATAAACAAGTTCCACAGCAATTTGATTTAGAAAATTCGATGCAT
ATGTTAACATCAAATCTTACTTTCACTGTTTACTCAGATCTGCTTGCATTTCGATCGGCC
GATACAGTAGAACCTATAAATGCAGTTGCATTTGATAATATGCGCATCATGAACGAGTTG
TAAACGCCAAC

Rotavirus A strain Rotashield RRV VP2 gene, complete cds

>contig_5 reverse complement

-----ACAGAAAGCGTGGAGCGCGTCGTGAGACGAATTTAAA
ACAAGATGATCGAATGCAAGAAAAAGAAAAATAAAAACGTAAATACTAATAGTGAAAA
TAAAAATGCTACAAAACCTCAATTATCAGAGAAAAGTGCTATCTCAGAAGGAAGAGGTGAT
TACAGATAATCAAGAAGAAATTTAAATAGCTGATGAAGTTAAAAAATCTAATAAAGAGGA
ATCAAAAACAATATTAGAGGTTCTAAAAACTAAGGAAGAACATCAAAAAGAAAGTTCAATA
CGAAATACTACAGAAAAAATACTACTTTTGAACCAAAAAGAAATCTATACTAAAGAAAT
AGAAGATATTAACCAGAGCAAGTTAAAAAGCAAACCAAAATTTTCAGAATATTTGAACC
TAGGCAACTACCAGTATACAGAGCAAACGGAGAGAAAGAACTACGCAACAGATGGTATTG
GAAGTTAAAACGAGACACCTTGCCCGATGGAGATTATGATGTGAGAGAATATTTTTTAAA
TTTGTATGATCAAGTACTAACTGAAATGCCAGATTATTTACTACTTAAAGACATGGCTGT
TGAAAACAAGAATTCTAGAGATGCAGGCAAAGTTGTTGACTCTGAAACTGCAGCCATTTG
CGATGCGATTTTCCAAGATGAAGAAACCGAAGGTGTAGTAAGAAGATTATAGCAGAAAT
GAGGCAAAGAGTACAAGCTGATCGAAATGTAGTTAATTACCCATCAATATTGCATCCAAT
TGATCATGCCTTTAAATGAGTATTTTTTACAGCATCAGTTAGTTGAACCATTGAATAATGA
TATAATATTCAATTACATACCTGAAAGAATACGGAATGACGTAAACTATATACTGAACAT
GGATCGAAATTTACCTTCAACAGCTAGATACATTAGACCAAAATTTACTTCAAGATAGACT
CAATTTGCATGATAACTTCGAATCCTTATGGGATACTATAACTACATCAAACACTACATCTT

AGCTAGATCAGTTGTGCCAGACCTTAAGGAACTAGTGTCCACCGAGGCTCAAATACAAAA
AATGTCACAGGATTTGCAATTAGAGGGCGCTGACAATTCAATCAGAAACACAATTTTAAAC
AGGTATCAATTCACAGGCAGCTAATGACTGCTTTAAGACGTTAATTGCCGCTATGCTTAG
TCAACGTAATATGCTTTAGATTTTCGCTACTACAAACTACATGTCATTAATTTTCAGGGAT
GTGGTTATTAACAGTTGTACCTAATGATATGTTTCATACGTGAATCCCTAGTAGCATGTCA
ATTGGCAATAATTAATACCATCATATATCCAGCCTTTGGAATGCAGAGAATGCATTACAG
AAATGGTGACCCCAAACTCCTTTTCAGATCGCTGAACAACAAAATTCAGAACTTTCAGGT
GGCCAATTGGCTACATTTTGTAAACAATAATCAATTTAGACAAGTAGTAATTGATGGAGT
ATTAAACCAAGTTCTGAATGATAATATAAGAAATGGACATGTAGTTAATCAATTGATGGA
AGCTTTAATGCAATTTGTCACGACAACAATTCCTCAACCATGCCAGTAGATTATAAAAAGATC
AATACAGAGAGGAATTAATCTTCTATCGAATAGATTAGGACAATTTGGTTGACCTAACTAG
GCTATTGGCATATAATTATGAAACTCTGATGGCGTGCATTACCATGAACATGCAACATGT
ACAAACTCTAACTACTGAAAAGTTGCAATTAACATCAGTTACTTCTTATGTATGTTAAT
AGGAAATGCTACAGTTATACCAAGTCCACAAAACATTATTTTATTATTATAACGTCAACGT
CAATTTTCATTCAAATTACAATGAAAGAATAAATGACGCAGTAGCAATCATAACCGCCGC
AAATAGATTGAATTTGTATCAGAAAAAGATGAAGTCGATAGTTGAAGATTTCTTAAAGAG
ACTACAAATATTCGACATTTCTAGAGTTCCAGATGATCAAATGTACAGACTCAGGGATAG
ATTGAGATTACTCCGATTTGAAATTTAGAAGATTAGATATATTTAATTTAATATTGATGAA
TATGGAGCAGTTGAAACGCGCATCGGATAAAAATTGCCAGGGAGTGATTATAGCTTATAG
AGCATGTCAGTTAGAGAGGATGAAATGTATGGCTACGTTAACATAGCTCGTAATTTAGA
CGTTTTTCAGCAGATAAATTTAGAGGAGTTGATGAGAACGGGAGATTATGCACAAATTAC
TAATATGCTACTAAATAATCAGCCAGTGGCATTAGTAGGAGCACTACCATTTATAACAGA
CTCATCAGTTATCTCATTGGTAGCTAAATAGACGCTACTGTCTTGCACAAATTGTTAA
GCTCAGGAAGGTTGATACTTTAAAGCCAATCCTGTATAAAAATAAATTTCTGATTCAAATGA
TTTTTATCTTGTAGCGAATTATGACTGGGTTCCAACGCTACAACAAAAGTTTATAAACA
AATACCACAACAATTTGATTTTAGAGCATATGCATATGTTAACGTCTAATTTGACTTT
CACTGTATATTCGACCTTCTTGCATTCGTTTCAGCAGACACTGTTGAACCAATTAATGC
TGTTGCATTTGACAATATGCGCATCATGAACGAACTGTAAACGCCAACCCAC-----

VP3

>ENA|JF990807|JF990807.1 Rotavirus A UK WT BR-3 VP3 protein gene, complete cds.

>contig_40,34,30,9,44; >contig_35,37

ACCTCTGATGGTGTAACATGAAAGTATTAGCTTTAAGACATAGTGTGGCTCAGGTRTAT
GCGGACACTCAAATATATAYTCATGATGAAACTAAAGATGACTATGAAAATGCATTTTTR
ATTTCTAATCTCACTACACATAATATATTATCTRAATTATAGCGTTAAGACATTGCAA
ATATTRAATAAATCTGGTATAGCTGCGRTAGAAAATACAGAARAYKGGATGAATTGTTTACG
TTGATTAGRTGYAATTTACATAYGATTATATTGAYGACRTTGTTTAYCTTCATGACTAT
TCATATTATACTAATAATGAGATAAGGACTGATCAACATTGGGTAACCTAAGACAAATATA
GAAGATTATTTATTACCAGGATGGAARCTRAYGTATGTTGGATATAACGGAAATGACACA
AGAGGGCATTATAAYTTYTCTTTTAAATGTCAAATGCAGCTACAGAYGATGACGCAATA
ATAGAATATATYACTCAAATGAATTAGACTTYCAGAATTTTCACTTAAAAAGATCAAG
GAAAGGATGACAACACTACTGCCAATAGCRARGCTATCAAATCGTGTGTTTCAGAGACAAA
TTATTTAAGCATTAGTATCAGATCATAGTRGRGTAGTTAATGTTGGACCAAGGAATGAA
TCTATGTTTACTTTTTYTAGATCATCCATCAATAAAGCAGTTTTTCAAATGGRCCCTATTA
GTTAARGATACRATAAAGCTTAAACAAGAGAGATGGCTCGGTAAGAGACTRTRCAATTC
GACATCGGTCAGTATAAAAATATGTTAAATGTATTAACAACCTTATATCAATACTATGAC
ATGTATCATGAGAAGCCAATAATCTACATGTTAGGATCAGCACCTTCATATTGGATACAC
GATGTAAAACAATACTCTAATCTAAAATTTGAGACGTGGGACCCATTGGATACACCATAC
TCTGATTTACATCATAAAGAAGCTGTTTTATATAAGTGACGTAACCAAACCTTAAAGATAAT
TCGATATTATATAGATATACGAACGGATAGAGAAAATGCAGATTGGAAAACGTTGGAGG
AAGATTGTAGAAGAGCAGACCGTTAACAATTTGAATATCGCATACAAATACTTATCCACA
GGGAAAGCTAAAGTATGTTGTGTTAAAATGACTGCTATGGATTTAGAACTACCGATATCT
GCGAACTACTACACCACCAACTACAGAAATTAGATCAGAATTTTATTTAATAATGGAT
ATATGGGATTCTAAAGATAYYAARCGATTTATACAAAAGGCGTGTATATTCATAYATA
AACAATAYAATYACTGARAACGTGTTTATACAACAACCGTTTAAATTGARAACATTAAGG
AATGAGTATGTGGTTGCRITGTACGCGCTGTCTAACGATTTTAAACAATAGAGARGATGTR
RTTAAATTGRTTAAAYATCAGAARAATGCGYTAATAACTGTAAGRATTAATAATACATTT
AARGATGAACCAAAAAGTRGGTTTTAAAGATATTTAYGATTGGACTTTTTTGCCAACTGAT
TTTGAAACGAATGAGTCAATAATTACGTCATAYGATGGTTGTCTAGGTRTGTGTTGTTA
TCAATATCATTAGCYTCAAACCAACTGGAAAATAATCATCTGTTTCAATTTTRAGYGGTACT
AATAAATATTTTAAATTTGGATCAATTTGCAAATCATATGAGYATATCAAGACGGTTCGCAT

CAAATACGATTTTCGGAATCAGCRACTTCGATTCAGGTTACATTTTTAGAGATTTATCA
AATAATAATTTAATTTAATAGGYACRAATGTTGAGAATTCGGTATCTGGACATGTGTAT
AATGCATTGATTTATTATAGATATAAATTATTC-----

-----ATATGCC

GACGATCCGAACATTTTTATTGGAATYRAGTTYAAAAATATACCRATGAATATGATGTT
AAAGTACCRCATCTTACATTTGGYGTATTRAATATTTTCAGATTCTATGGTRCCGGATGTA
GTAGYAATTTTRAAGAARTTTAAAARTGAATTGTTYAGAATGGATGTAACRACGAGTTAY
ACGTATATGTTATCAGAYGAAATCTATGTRGCAAACGTAAGYGGCGTGTTATCAACATAT
TTTAARCTTTACAATGCATTCTATAAAGAGCAAATTACGTTCCGGACAATCAAGAATGTTT
ATCCACAYATAACATTAAGTTTCAGTAACAAGARAGTAGTGAGRATAGRTAGTACGCGA
TTGAAATAGACTTTATATATTTGAGGAARATAAAAGGCGAYACAGTGTTTCGATATGRCT
GAGTGAGCTAAAAAC

Rotavirus A strain Rotashield RRV VP3 gene, complete cds

>contig_59 reverse complement; >contig_36 reverse complement; >contig_52 reverse complement

-----ACTAAGTGAAAAACATCA

GCGTATAGTGAACATTGGACCGAGAAATGAATCAATGTTTACCTTCTAAATTTCCATC
AATTAAGCAATTTTCAAATGGACCATATTTAGTTAAAGATACTATTAATTAAGCAAGA
AAGATGGTTGGGGAAAAGAGTGTCTCAGTTCGACATTGGACAATACAAGAACATGAT---

-----ACGCATT

ATCAAATGATTTAATGATAGAACGGATGTAATTAACCTTAATTAACAATCAGAAACAATC
GCTCATTACTGTAAGAATTAATAACACATTTAAAGATGAACCAAAGGTAGGGTTTAAGAA
TATATATGATTGGACCTTTCTACCAACAGATTTTACTACAACTGATGCCATAATAACCTC
ATACGATGGATGTTTAGGTATATTTGGATTATCAATATCCTTAGCTTCAAAGCCTACGGG
AAATAATCACTTGTTTATCTTAAATGGAACCGATAAGTATTATAAATTGGATCAATTTCGC
AAACCATACTGGCATTTCAGAGATCAGACCAAATTAGATTTTCAGAATCCGCAACATC
GTATTCAGGATACATATTCAGAGATTTATCTAACAACAATTTAACTTGATTGGGACAAA
TGTAGAAAATTCAGT-----ATTTATTATAGATATAACTA
CTCTTTTGACTTAAAAAGATGGATATACTTACACTCGATAGAAAAAGCTGATATAGAAGG
TGAAAGTATTATGAACATGCTCCGATAGAATTGATTTATGCCTGTAGATCAGCAAAGA
ATTCGCTTTTATTACAAGATGATCTTACTGTATTACGTTATGCTAATGAAATCGAGAGCTA
TATAAATAAAGTATATAGTA-----

ATCACTTGAGAAAAGACGTGCACAGATATCAGCTTACTGACTATGCTACAAAAACCGGT
CACTTTTAAATCAAGTAAAATAACAATAAATGATATACTTAGAGATATAAAGCCATTTTT
TACTGTAAGTGAAGCGCACTTACCGATACAATATCAAAAATTTATGCCAACTTACCAGA
CAATGTACAATATAAATTCAGTGTATAGGATCCAGAACCTATCAAATTGAAGATGACGG
CTCAAAAATCAGCCATATCTCGGCTAATATCAAAAATACTCAGTTTATAAAACCGTCAATTGA
AGAGTTATATAAAGTAATTTCACTACACGAGAATGAAATACAACCTGTATTTAATCTCACT
GGGCATACCGAAAATAGACGCTGATACGTACGTCGGATCAAAAATTTATTCTCAAGATAA
ATACAGGATATTGGAGTCGTATGTGTATAAATTGTTGTCTATTAATTATGGATGTTATCA
ACTATTTGACTTTAATTCACCAGATCTAGAAAAGCTGATTAGAATACCATTTAAAGGAAA
GATACCAGCTGTTACTTTTATACTGCATTTATATGCTAAACTAGAAGTCATAAATTATGC
CATTA AAAATGGGTCAATGGATAAAGTTTGTCTGTA ACTACCCAAAATCGGAAATGATAAA
GTTATGGAAGAAGATGTGGAAACATTACGTCAATTACGTTACCGTATACCAACGCGAACTT
CTTTCAAGATTAG-----

>contig_1

AGCGCTCTAATCTTGAAAGAAGTTTGCATTGGTATACGGTGAACGTAGTGATGTAATGTT
CCACATTTTCTCCATAATTTTATCATTCTGATTTTGGGTAGTTNCAGAATAANCTTAT
CCATGAGCCATTTTGTATGGCATGATTTATAAAGTTCTAGCTTAGCGTATAAATGCAATAT
AAAAGTGACAGCTGGTATNTTTCCTTTAAACGGTATTCTGATCANNTTTTCTAGATCTGG
TGAATTTAAAGTGAATAGTTGATAACATCCATAATTAATAGATAATAAGTTANATACATA
CGACTCTAATATCCTGTATTTATCTTGAGAATAAATTTTCGATCCGACGTACGTATCAGC
GTCTATTTTCGGTATNCCTAGTGAGATCAAATATAGTTGTATTTCACTCTCGTGTAGTGA
AATTACTTTGTATAACTCTTCGATTGACGGCTTGTA AACTGAATACTTTGATATTAGTCG
AGATATAGCTGACTTTGAACCGTCATCTTCAATTTGGTAGGTTCTGGATCCTATACACTG
AATTATATACTGCACATTGTCTGGTAAAGTTGGCATAAATTTTGTATTTGTATCGGTAA
ATGTGCTTCGTTTACAGTGA AAAATGGCTTTATATCTCTAAGTATATCATTATTGTTAT
TTACTTTGATTTAAAAGTAAACCGGTTTTTGNAGCATAGTCAGCAAAGCTGATATTTGCGC
ACGCTTTTTCTCAAGTGATATTGGTGCATGAGTTCAACTTTGCCTTTTCAGTCAATGC
TATTCCTCTAGACACTATATTATTCTTTGAAAACAACAGCTGCNCAGATAATCTAGACAC
ATAATCTTAAACGTNGATGATGCAGCTATCTCATCAGCTATTCCTGACTTCTGACTAGA
TAAAGACATGAACGCTCTTTGTATGTATACTTCNTCGTCAGTTGTCCCATACTCTATAAT
AAAGTCTCCGAGTCAAATACTTTAAANGTAGAGTTTCGTGGTTAACACGCGTTCAGAAGG
AAAGAGTCTTAGCGATCCGGTAAATAGCAACTGACGTCATTTGCATTATTTAGTTAAAAT
GAAGTCTCTGTCAGTTTCAAATCCCTCGAAGTCTATTCACAATATAGTTTGAATATAGGAC
AGCTGCTTGGTCCCCTGTGTNCTTTGTCTNTTTTNTCNTTATTCAGTAAATTTATTCC
AGCCCTAAAGAATATTTTCCACCTGCAATATACCTTTTAGCTATTTCTATTCCCACTGT
AGATACTAAGGCTTTAACTTTAGTATTCATTGCGCATATGTTTCTCTCACGTCGTTTGA
CACATCTTGAACCATTTGTTTACTTCTGTATTGAATTGCAATACTGCGTAATTGTC
ATCTCCGTCAACTCTTATTATCTTCGTCGCGAATGAATATTTGTTAGAAATGCGTGATAA
AACGTTTTAATCAGCTGCTAAATTTGCTATTGAATTCGCTGCTTTTCGTCGNTTCTCTCC
TGACGCTACAGCCCATATTGTATCTTTAATAACATTACCATCTGGTATTGAAACGTA
TGAATCCATTAGATTAATTTGCGTCTGTTTATANAAGTTNAGCGTCTGNATAACTCTAGC
ATCATTAGTCATATTGGCTAGCATGTCCAATCCCATAAATTATCCCTTTCTAAATGGCTG
CGTATTGTGTTGAGATGAGTCCCCTGGGACACGTCGTATATAGTACCATAGAGTTATT
AGATAAAAAGCGTGAACATCNCCATAAGACAATAACTGATTTGACTGTGAGTAGAATTC
AGCATATTTCTAGTATGTTTCGCNTAAATTAGCATTTTTTCAACTACAGCATGTTGTGC
TATGAAATATTCATATGGTAAANATAAATATTATTCTAGTCCGCTTCTCTGGTACATCTCT
CCTTCTAATGGTATCGGTTTATCGACATTCAGTGGTGGTATTATGCCTGGNGTGTATCT
TCCATTAGCCATGTCATCCATTACATGCATATTTCTTTTAGTCGAAAAAATTGCTTTCT
ACCAAATTTTAGTTGCTTGTATTACCATTCGACGCTGATGACATTGATAGTAAACCAGC
NAATTCAGAATCCTGTAACAAATGGTCATCATGCTTTACTGGTTCCTCAAGCATTTTCAC
AACTCATCTCTTATTAGCATTGTGTATTCTCGATACATTTTCGTCATCTACATCTTCTGT
ATACTCAGTTTTCAATTGATCTAGTGCGGGCTCCAACATTTTCTGTTTCTGAATCCGAC
NTGAAATGACCACGAATATATTTAGCCATCAATGGAAATTTTTCAATAGAGCAATCGAC
CAACCAGTCTGTATCATCTAGGTATGTCAGTTAACCCAGCTTTTCTCATATTGTCAAG
CATTTGTTTTAATTCATCAAAATGTTGGTCAGGAACATTTGCTCGTACATATTTGTTTGA
AAACTCTAGTTCTAATTTCTTCAATTCGTAATAAATGTTCCGTTTATATCCACTAAAAGCTAC
CAGAATTGACATTGGTGTATGACACCAGTTTTGCCAGAGTCGATCTATTAGAATATGACAG
TACTATCAGTTCTCTCGCAATTAATAATCTTCATGAGAAAAAAGTACATCAGCATTTTC
AATTGAAGAATTTGCCCATGTTACCAAGTAGTACGGCTTATCTTTTCACTTACATTTTC
ATATCTATATTTTCGNTTGTGCTTGGTACACCATAATTTATTACTGTTGAAGCTACTAT

AGTNAATAAGTCTAATCTCCTTTTGTAAATTTTGAGTTTTTCAGCAACGTCATTTTCATG
TTTTTCCAACCAGAACATAAAGTGCATTTAAATNGATGATAATGAAGTTAAAAATTGCTGG
ATCCATCAATNAATCAGTATATTCCTCTGCGNGTTGGGAANAGTTCAGATGTTATCTTGTT
ATTTTCATAATCCAACATTCACCTGTCAAATCTGCTTCTAGCGGCTTACCTTTTGCATA
TTTTACTAATTTCTTCAACAGCGTTATATTTATCATAAAGAGTACGATAAATATGACAA
CAGTGTGGCATTCTCNATAACATCGCTATATTTCAACAAAGAGCTTTTTCAATGATAGTCC
ATCTTTGAGTTTTCTAAGCATTTAGAATGAAATTCATACATCTATTCTAATTCAT
ATTGGAAGAATAGTANATTGGAATTTGAACTGCGGATTGTGAGTTATATATGAAGTATAA
TCTAATCTTGTGAGAATATTTATCATTATATATAAATCACAATCCGCAGTTCAAATTC
AATTTACTATTCTTCCAATAGTGAATTAGAAGATAGATGTATTGAATTTCAATCTAAATG
CCTAGAGAACCAAGAATGGACTATCACTAAAAAACTTTTTACTGAATACAGCGATGT
TATAGAGAATGCTACATTGCTCAATATTATCATACTCTTATGATAAATATAACGCTGT
TGAAAGGAAATTGGTGAAATATGCAAAAGGTAAGCCGCTAGAAGCAGACTTGACAGTGAA
TGAATTAGATTATGAAAATAACAAGATAACATCTGAACTTTTCCAACAGCAGAAGAATA
CACTGATTCATTGATGGATCCAGCAATCCTAATTCATTGTCATCAAATTTAAATGCAGT
TATGTTTTGGTTGGAAAAGCATGAAAATGATGTTGCCGAAAACTAAAATTTACAAAAG
GAGATTGGATTTATTTACTATAGTAGCTTCAACAGTAAATAAATATGGTGTACCAAGGCA
TAATGCGAAATATAGATATGAATATGAAGTAAATGAAAGATAAGCCATATTACTTAGTGAC
ATGGCGCAATTTCTCAATTTGAAATGCTAATGTGACTTTTTTCTCATGAGGATTATTTAAT
TGCGAGAGAATTGATAGTACTATCATATTCTAACAGATCGACTCTAGCAAAGCTGGTGT
ATCACCGATGTCAATTTCTAGTAGCTTTAGTGGACATAAATGGAACATTTATTACAAATGA
AGAATTAGAAGTACTAGAGTTTTCAATAAATATGTGCGGGCAATAGTCCCAGATCAAACATT
CGATGAATTTAAACAGATGCTTGACAACATGAGGAAAGCTGGGTTAACTGATATACCTAA
GATGATACAGGATTGGTTGGTTGATTGTTCTATTGAAAAATTTCCACTGATGGCTAAAAT
ATATTCGTGGTCATTTTCATGTGCGGTTTCAGAAAAGCAGAAAATGTTGGATGCCGACTAGA
TCAACTAAAAACTGAGTATACAGAGGATGTAGACGATGAAATGTATCGAGAATATACAAT
GCTAATAAGAGATGAGTTGTGAAAATGCTTGAGGAACAGTAAAGCATGACGATCATT
GTTACAGGATTCTGAACTAGCTGGTTTACTGTGATGTCATCAGCGTCAATGGCGAATC
AAGGCAACTAAAATTTGGTAGAAAAGACGATTTTCTGACTAAAAAGAATGCACGTGAT
GGATGACATGGCTAATGGAAGATATACGCCAGGTATAATACCACAGTGAATGTGCGATAA
ACCGATACCATTAGGAAGAAGAGATGTGCCAGGGAGACGGACTAGAATAATTTATCCT
ACCATATGAATACTTTATAGCACAACATGCTGTAGTTGAAAAGATGTTAATCTATGCAAA
ACATACTAGAGAATATGCTGAATTTACTCACAGTCAAATCAGTTACTATCTTATGGTGA
TGTTACACGCTTTTTATCCAATAACGCTATGGTGCTATATACAGACGCTCTCCCAATGGGA
TTCATCTCAACATAATACGCAGCCATTTAGGAAAGGGATAAATAATGGGATTGGACATGTT
AGCTAACATGACTAATGATGCTAGAGTTATTCAGACACTAAAATTTGTATAAGCAGACACA
AATAAACCTGATGGATTCATACGTTCAAATACCAGATGGTAATGTTATTAATAAAGATACA
GTATGGAGCTGTAGCGTCAGGAGAGAAGCAGACAAAAGCAGCAAATTCATAGCGAATTT
AGCATTGATTAAGACTGTCTTATCACGTATTTCCAACAAATATTCATTCGCGACGAAAAAT
AATAAGAGTCGACGGAGCAGCAATTTACGCAGTGTGCGAGTTAATACAGAAGTAACCAA
GCAAATGGTTCAAGCGTATCAAACGAGCTGAGAGAAAACGATGCGCGAATGAATGCTAA
AGTTAAGGCATTAGTATCCACAGTGGGAATAGAAATAGCTAAGAGGTATATTGCAGGTGG
AAAAATATTCTTCAGGGCTGGAATAAATTTACTGAATAATGAAAAGAGAGGACAAAAGTAC
ACAGTGGGATCAAGCAGCTGTTCTATATTCAAACATATATTGTGAATAGGCTTCGAGGATT
CGAAACTGATAGAGAGTTCATTTTACTAAAATAATGCAAATGACGTCAGTTGCTATTAC
TGGATCGTTGAGACTCTTCTCTTGAACGCGTGTAAACCACGAATCTACATTCAAAGT
GTTTGATTCGGAGGACTTTATTATAGAATATGGGACAACGATGACGAAGTATACATACA
AAGAGCGTTTATGCTTTTGTGCGAGTCAGAAGTCGGGAATAGCTGATGAGATAGCTGCATC
ATCAACATTTAAGAATTATGTGTCTAAAATTTCTGAGCAGTTGTTGTTTTCAAAGAATAA
CATAGTGTCAAGAGGAATAGCATTGACTGAAAAGACGAAGTTAAACTCATACGCACCAAT
ATCACTTGAGAAAAGACGTGCACAGATATCAGCTTTACTGACTATGCTACAAAAACCGGT
CACTTTTAAATCAAGTAAAATAACAATAAATGATATACTTAGAGATATAAAGCCATTTTT
TACTGTAAAGTGAAGCGCACTTACCGATACAATATCAAAAATTTATGCCAACTTTACCAGA
CAATGTACAATATATAATTCAGTGTATAGGATCCAGAACCTATCAAATGAAAGATGACGG
CTCAAAAATCAGCCATATCTCGGCTAATATCAAATACTCAGTTTATAAACCCTCAATTGA
AGAGTTATATAAAGTAAATTTCTACTACACGAGAATGAAATACAACCTGATTTAATCTCACT
GGGCATACCGAAAATAGACGCTGATACGTACGTCGGATCAAAAATTTATTCTCAAGATAA
ATACAGGATATTGGAGTCGTATGTGTATAAATTTGTTGCTATTAATTTATGGATGTTATCA
ACTATTTGACTTTAATTCACCAGATCTAGAAAAGCTGATTAGAATACCATTTAAAGGAAA
GATACCAGCTGTTACTTTTATACTGCATTTATATGCTAAACTAGAAGTCATAAATTATGC
CATTAATAAATGGGTCATGGATAAGTTTGTCTGTAACCTACCAAAAATCGGAAATGATAAA

GTTATGGAAGAAGATGTGGAACATTACGTCATTACGTTACCGTATACCAACGCGAACTT
CTTTCAAGATTAGAGCGCTTAGAT

NSP4

Rotavirus A strain Rotashield ST3xRRV NSP4 gene, complete cds

>contig_65 reverse complement

-----TTGAAACTGGCTGGATATAAAG
AACAAATTACTACTAAAGATGAAATTGAAAAGGCAAATGGACAGAGTTGTAAAAGAAATGA
GACGTCAGCTGGAAATGATTGATAAGCTAACCACTAGAGAGATTGAGCAAGTCGAACTAC
TTAAACGAATTCATGATATGTTGAT-----

NSP1

Rotavirus A strain Rotashield DxRRV NSP1 gene, complete cds

>contig_15 reverse complement

-----CCACATCTTTTAAAATTAAGAACTTTTGAATCT
CCAATAACGAAGGAAAAATTACAATGCATTATTAATTTATATGAATTACTATTTCCAATT
AATCATGGGGTTATCAATAAATTTAAAAAACAATAAACAGAGGAAATGTAGAAATGAG
TTTGACAAAATCATGGTATAATCAGCTACTGCTTCCAATTACTTTAAATGCTGCAGTTTT
AAGTTTCACTCAAGGGATGTTTATGTTTTTGGATTTTATGAAGGATCATCACCATGCATA
GATTTGCCATATAGACTTGTAATTTGCATTGATTTATATGATAAACTATTGTTAGATCAA
GTAAACTTTGAAAGGATGAGTTCTCTTCCAGATAATTTACAATCCATCTATGCAAAACAAA
TACTTCAAATTAAGTAGACTTCCCTTCAATGAAGCTAAAACGAATCTATTACTCAGATTTT
TCCAACAGAATTTGATTAATAAGTACAAGCTAAAAGTTCGCATAGTTCTTAGGAATCTT
ACTGAATTCACCTGGGATTCTCAAAGTATTTACATCATGATCTGATTAATGATAAAGAT
AAAATACTTGCCGCATTATCAACATCATCTAAAACAATTTGAAACACATGATTTAAAT
TTGGGGAGAATAAAAAGCTGACATTTTGAAGCTTGGACATCACTGCAAACCAAATTACATC
TCATCAAATCATTGGCAACCAGCATCAAAAATTTCTAAATGTAATGGTGTAATGTA
TATGCATTCAGAGACATGGATTGGAAGATGGAATCAATGTACAATGAACTTTTAAGCTTT
ATCCAATCTTGCTATAAAAAGTAATGTTAATGTAGGACATTGTAGTTCAATTGAAAAAGCT
TATCCATTAGTTAAAGATATACTTTGGCATTCAATTACTGAATATATTGATCAAATGTT
GAGAAATGTTTAAATACAATGAATCCAGTGAAGTAAATGAACAGCAGGTAATAAAGTTC
TGTTGGCAAATAGATATCGCATTATATATGCACATTAATGATACTGGAAACCGAGGCT
CTTCCATTTACTTTTACATTGAATCAGTTCAATTCTATAATTAAGGGATTGTGAACCAA
TGGTGTGATGTTGCTGAATTAGATCACTTGCCGTTATGCAC-----

>ENA|HQ186289|HQ186289.1 Bovine rotavirus A strain UK nonstructural protein 1 (NSP1) gene, complete cds.

>contig_17 reverse complement; 20

-----GTCAATATACAAATTTAACATATTGCAGAGGATGTGCTTTGTAC
CATGTATGTCAGTGGTGCAGTCAATATAATAGGTGTTTCTTAGATGAAGAACCCTCACTTG

Anexo 2 Porcentaje de identidad en la base de datos RotaC.

| Producto génico | % de identidad (Valores cut-off) | Genotipos | Nombre de los genotipos |
|------------------------|---|------------------|-----------------------------------|
| VP7 | 80% | 27 G tipos | Glicosilasa |
| VP4 | 80% | 37 P tipos | Sensible a proteasa |
| VP6 | 85% | 18 I tipos | Cápside interna |
| VP1 | 83% | 9 R tipos | Polimerasa RNA dependiente de RNA |
| VP2 | 84% | 9 C tipos | Proteína del Core |
| VP3 | 81% | 8 M tipos | Metiltransferasa |
| NSP1 | 79% | 18 A tipos | Antagonista de interferón |
| NSP2 | 85% | 10N tipos | NTPasa |
| NSP3 | 85% | 12 T tipos | "Enhancer" de la traducción |
| NSP4 | 85% | 15 E tipos | enterotoxina |
| NSP5 | 91% | 11 H tipos | Fosfoproteína |

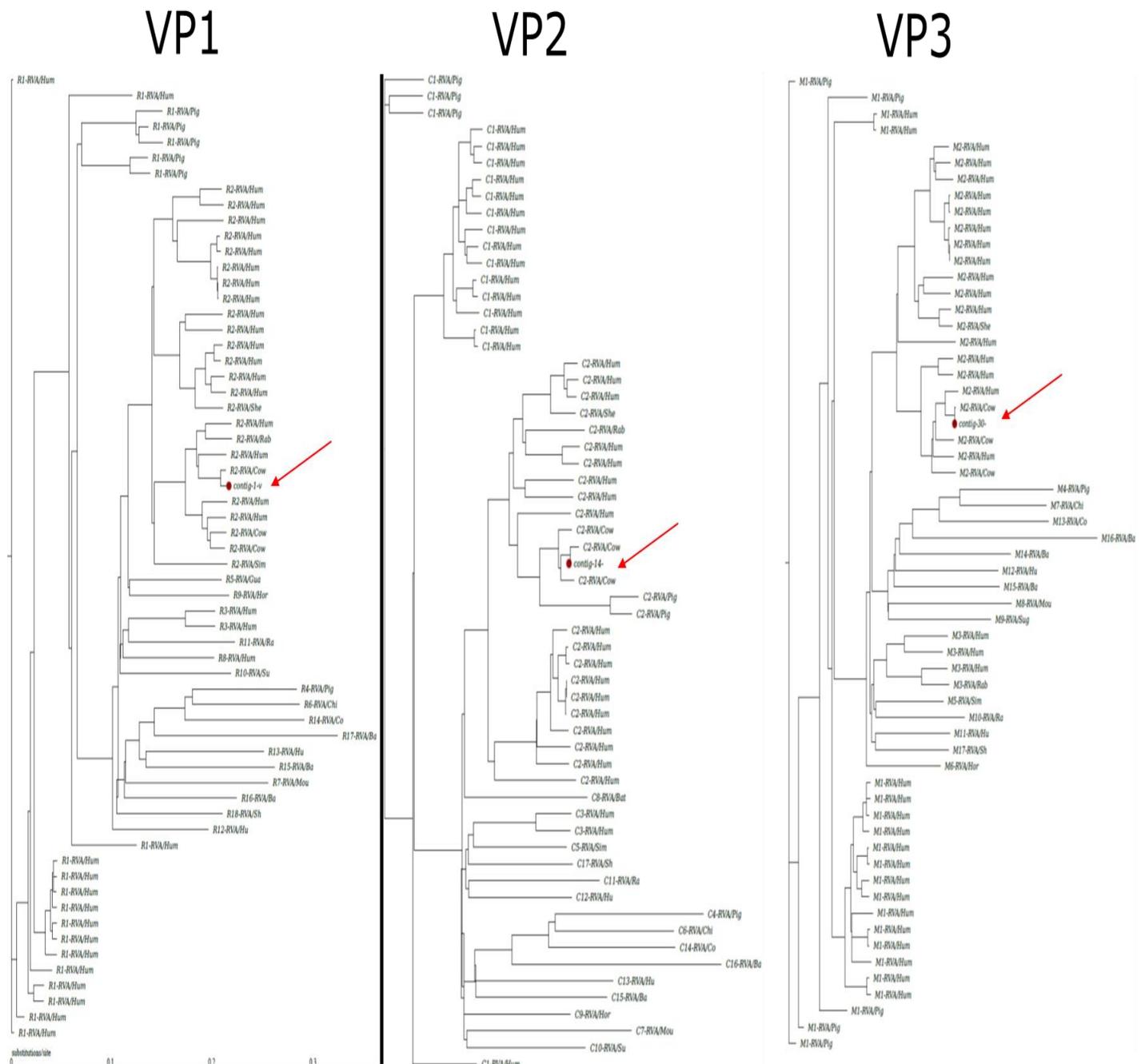
Anexo 2. Porcentaje de identidad en la base de datos RotaC. Porcentaje de identidad de los segmentos tenidos en cuenta en la base de datos RotaC para asignar la identidad a los fragmentos analizados de rotavirus

Anexo 3. Genotipos de rotavirus TRUYO

| Gen | Genotipo | especie | % identidad |
|------|----------|-----------|-------------|
| VP1 | R2 | UK (G6P5) | 99.2% |
| VP2 | C3 | RRV | 88.7% |
| VP2 | C2 | UK | 100% |
| VP3 | M2 | UK | 99,6% |
| VP4 | ND | ND | ND |
| VP6 | I2 | TRF | 999,7% |
| VP7 | ND | ND | ND |
| NSP1 | A9 | TRF | 81,8% |
| NSP1 | A3 | UK | 99,7% |
| NSP2 | N2 | UK | 99.9% |
| NSP3 | T7 | UK | 100% |
| NSP3 | T3 | RRV | 100% |

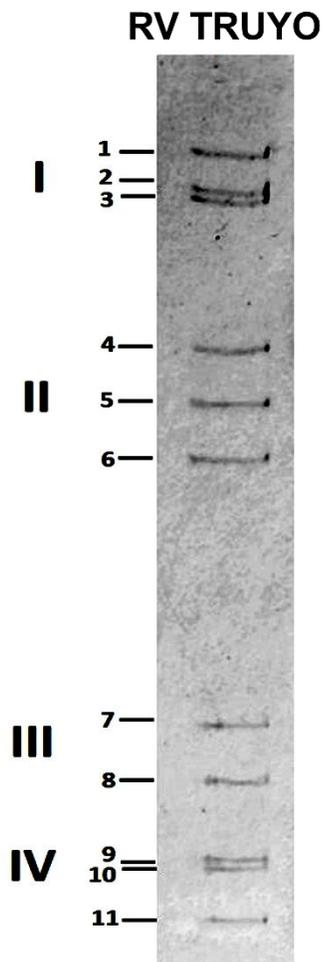
Anexo 3. Genotipos de rotavirus TRUYO. Se muestra el genotipo obtenido para cada segmento del rotavirus TRUYO encontrado en la secuenciación y el porcentaje de identidad. Para algunos segmentos se obtuvieron más de 1 fragmento y representan genotipos diferentes. El análisis se realizó usando la base de datos RotaC v2.0.

Anexo 4 Análisis filogenético de VP1, VP3 y VP3



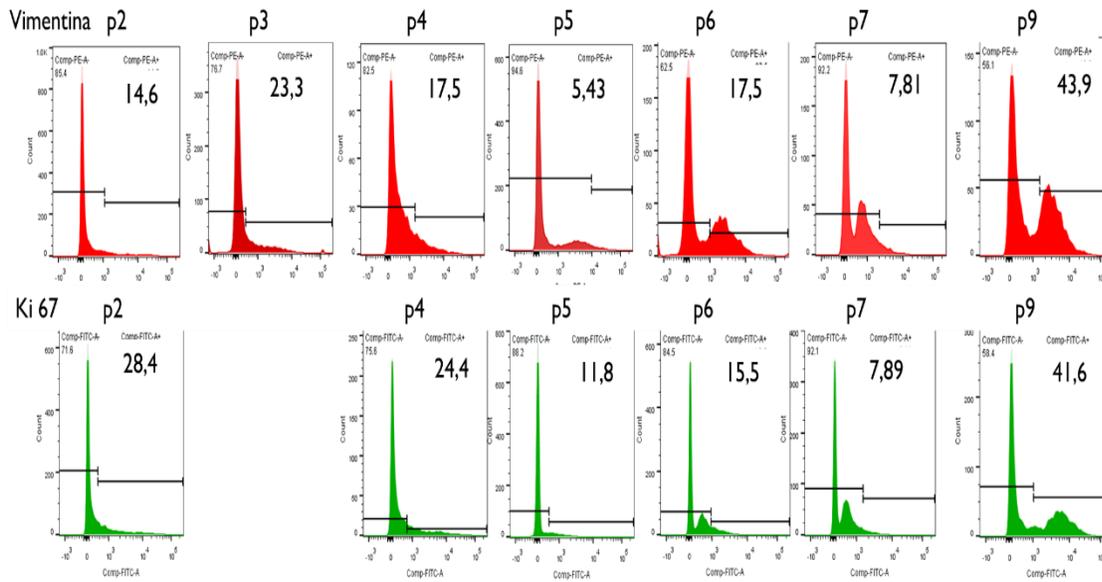
Anexo 4. Análisis filogenético de vP1, VP2 y VP3. Las secuencias obtenidas para los segmentos codificantes de VP1, VP2 y VP3 fueron usados para realizar análisis filogenético mediante uso de la base de datos RotaC v2.0. Las flechas indican el “contig”2 analizado, el cual corresponde a cada una de las proteínas indicadas

Anexo 5. Electroferotipo de rotavirus TRUYO.



Anexo 5. Electroferotipo de rotavirus TRUYO. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% donde se muestra los 11 segmentos de dsRNA que comprenden el genoma completo del rotavirus TRUYO. Las bandas fueron visualizadas con tinción de plata

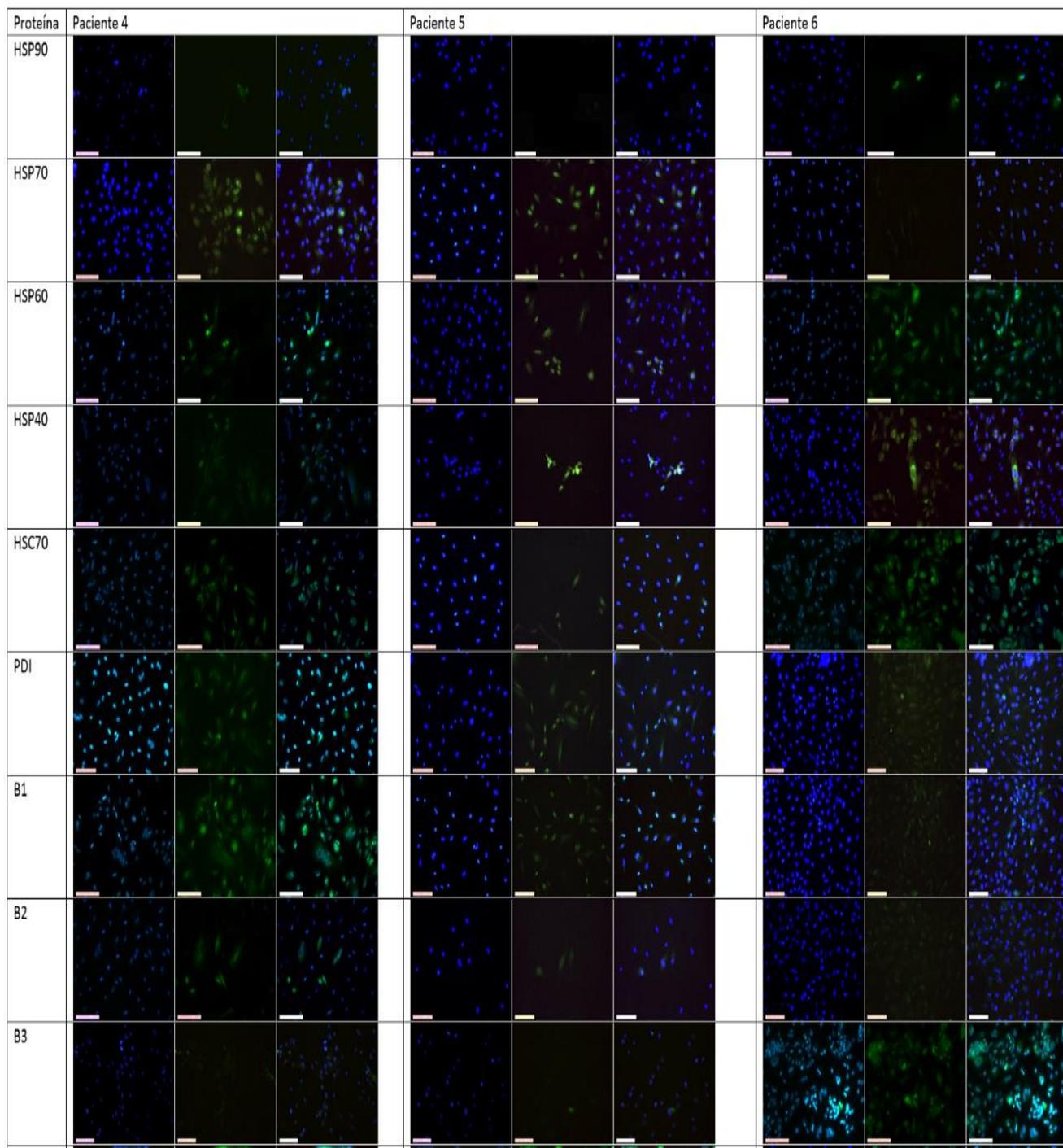
Anexo 6. Perfiles de citometría para Vimentina y CK8/18 de muestras de pacientes

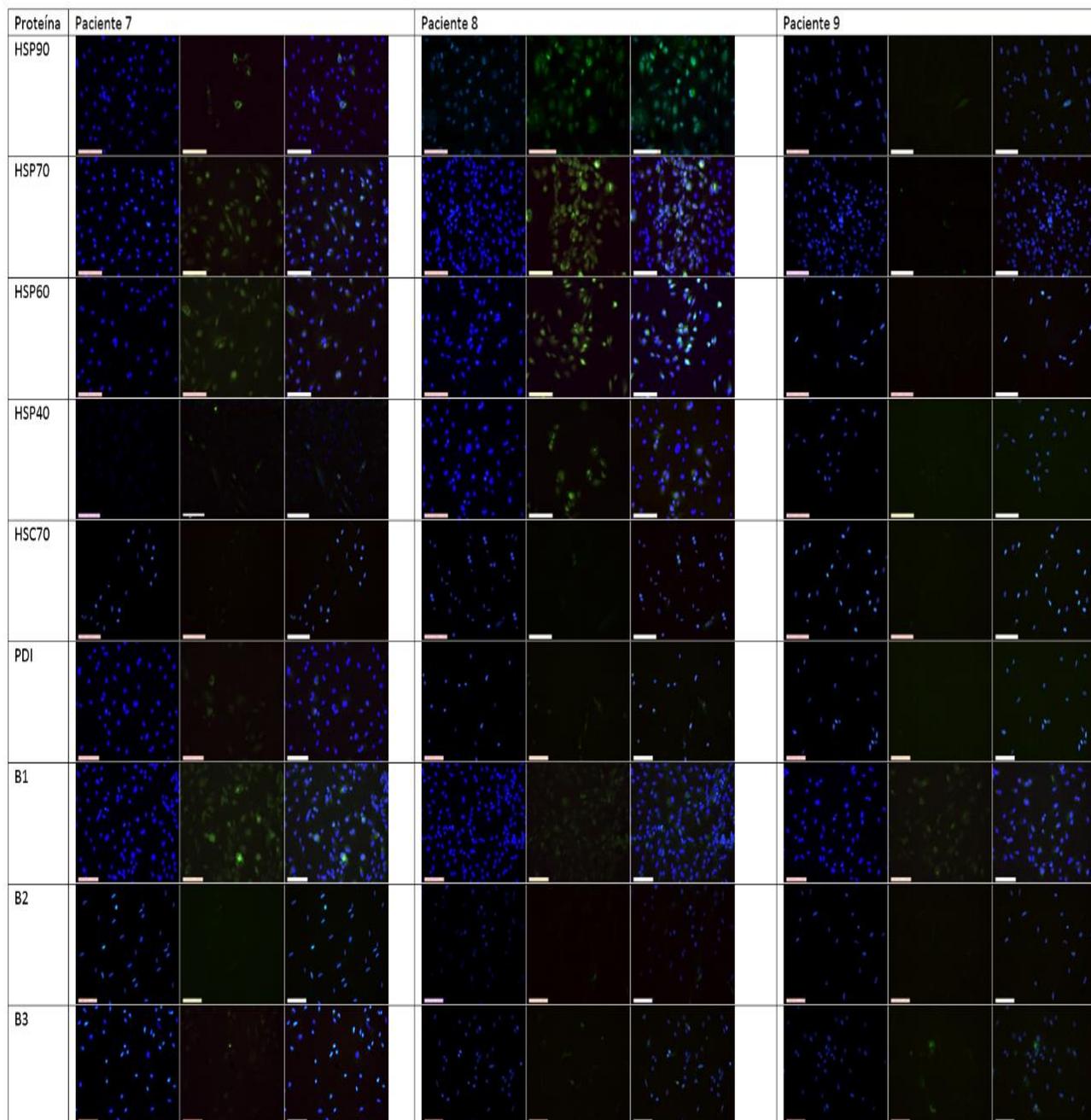


Anexo 6. Perfiles de citometría para Vimentina y CK8/18. Se muestra el perfil de citometrías para Vimentina y CK8/18 para las muestras de pacientes con códigos p2 al p9. Las muestras fueron tratadas como se describe en materiales y métodos.

Anexo 7. Epi-inmunofluorescencia para las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, β 1, β 2 y β 3 en 9 cultivos primarios

| Proteína | Paciente 1 | | | Paciente 2 | | | Paciente 3 | | |
|-----------|------------|--|--|------------|--|--|------------|--|--|
| HSP90 | | | | | | | | | |
| HSP70 | | | | | | | | | |
| HSP60 | | | | | | | | | |
| HSP40 | | | | | | | | | |
| HSC70 | | | | | | | | | |
| PDI | | | | | | | | | |
| β 1 | | | | | | | | | |
| β 2 | | | | | | | | | |
| β 3 | | | | | | | | | |





Anexo 7. Imágenes representativas de inmunofluorescencia para la evaluación de las proteínas proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$. El tejido tumoral fue disgregado como se describió en materiales y métodos, luego las células obtenidas fueron sembradas en laminillas portaobjetos de 12 mm. incubadas durante 16-18 h a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% sin metanol, bloqueadas con SFB al 3% y evaluadas para la presencia de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ mediante el uso de anticuerpos policlonales comerciales. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio Leyca 2500 en objetivo de 20X.

12. REFERENCIAS.

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
2. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(7):502.
3. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of pathology*. 2010;177(3):1053-64.
4. Chien J, Kuang R, Landen C, Shridhar V. Platinum-sensitive recurrence in ovarian cancer: the role of tumor microenvironment. *Frontiers in oncology*. 2013;3:251.
5. Onodera Y, Nam J-M, Sabe H. Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;140(1):1-9.
6. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(1):9.
7. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(1):15-27.
8. Tomala K, Korona R. Molecular chaperones and selection against mutations. *Biology direct*. 2008;3(1):5.
9. Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C. Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2011;1816(2):89-104.
10. Arispe N, Doh M, Simakova O, Kurganov B, De Maio A. Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *The FASEB journal*. 2004;18(14):1636-45.
11. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS letters*. 2007;581(19):3689-94.
12. Tang D, Khaleque MA, Jones EL, Theriault JR, Li C, Wong WH, et al. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell stress & chaperones*. 2005;10(1):46.
13. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell stress & chaperones*. 2005;10(2):86.
14. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(9):642.
15. Gentschev I, Adelfinger M, Josupeit R, Rudolph S, Ehrig K, Donat U, et al. Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. *PloS one*. 2012;7(5):e37239.
16. Gillory LA, Megison ML, Stewart JE, Mroczek-Musulman E, Nabers HC, Waters AM, et al. Preclinical evaluation of engineered oncolytic herpes simplex virus for the treatment of neuroblastoma. *PLoS One*. 2013;8(10):e77753.
17. Li H, Nakashima H, Decklever T, Nace R, Russell SJ. HSV-NIS, an oncolytic herpes simplex virus type 1 encoding human sodium iodide symporter for preclinical prostate cancer radiovirotherapy. *Cancer gene therapy*. 2013;20(8):478.
18. Ganesh S, Gonzalez-Edick M, Gibbons D, Ge Y, VanRoey M, Robinson M, et al. Combination therapy with radiation or cisplatin enhances the potency of Ad5/35 chimeric oncolytic adenovirus in a preclinical model of head and neck cancer. *Cancer gene therapy*. 2009;16(5):383.
19. (NLM) TNLoM. Clinicaltrials 2015 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/about-site/link-to>].

20. Russell SJ, Federspiel MJ, Peng K-W, Tong C, Dingli D, Morice WG, et al., editors. Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. Mayo Clinic proceedings; 2014: Elsevier.
21. Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Advances in virology*. 2012;2012.
22. Choi I, Lee Y, Yoo J, Yoon A, Kim H, Kim D, et al. Effect of decorin on overcoming the extracellular matrix barrier for oncolytic virotherapy. *Gene therapy*. 2010;17(2):190.
23. Kim W, Seong J, Oh HJ, Koom WS, Choi K-J, Yun C-O. A novel combination treatment of armed oncolytic adenovirus expressing IL-12 and GM-CSF with radiotherapy in murine hepatocarcinoma. *Journal of radiation research*. 2011;52(5):646-54.
24. Smith E, Breznik J, Lichty BD. Strategies to enhance viral penetration of solid tumors. *Human gene therapy*. 2011;22(9):1053-60.
25. Wojton J, Kaur B. Impact of tumor microenvironment on oncolytic viral therapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(2-3):127-34.
26. Pesavento J, Crawford S, Estes M, Prasad BV. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*: Springer; 2006. p. 189-219.
27. Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS. The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(11):739.
28. Trask SD, McDonald SM, Patton JT. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature reviews microbiology*. 2012;10(3):165.
29. Trejo-Cerro O, Aguilar-Hernández N, Silva-Ayala D, López S, Arias CF. The actin cytoskeleton is important for rotavirus internalization and RNA genome replication. *Virus research*. 2019;263:27-33.
30. Abdelhakim AH, Salgado EN, Fu X, Pasham M, Nicastro D, Kirchhausen T, et al. Structural correlates of rotavirus cell entry. *PLoS pathogens*. 2014;10(9):e1004355.
31. Desselberger U. Rotaviruses. *Virus research*. 2014;190:75-96.
32. Tsai V, Johnson DE, Rahman A, Wen SF, LaFace D, Philopena J, et al. Impact of human neutralizing antibodies on antitumor efficacy of an oncolytic adenovirus in a murine model. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(21):7199-206.
33. Gualtero D, Guzman F, Acosta O, Guerrero C. Amino acid domains 280–297 of VP6 and 531–554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection. *Archives of virology*. 2007;152(12):2183-96.
34. 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*. 2002;76(8):4096-102.
35. Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, López S, Arias CF. Integrin $\alpha\beta 3$ mediates rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(26):14644-9.
36. Santana AY, Guerrero CA, 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. *Archives of virology*. 2013;158(6):1323-36.
37. Guerrero CA, Guerrero RA, Silva E, Acosta O, Barreto E. Experimental adaptation of rotaviruses to tumor cell lines. *PloS one*. 2016;11(2):e0147666.
38. Castaño Toro C. Identificación de marcadores de muerte celular que produce rotavirus WTEW en líneas tumorales REH y U937: Universidad Nacional de Colombia.
39. Alfonso E, Rodríguez, S. Guerrero C. Interacción de las proteínas de choque térmico Hsp90 y Hsp70 con aislamientos de rotavirus en las líneas celulares U937. Universidad Distrital Frnsisco José de Caldas: Universidad Distrital Frnsisco José de Caldas; 2102.
40. Guerrero R, Guerrero C. Determinación del potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de cáncer de mieloma murino sp2/0-ag14. . Universidad Nacional de Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2012.

41. Silva E, Guerrero, C., Acosta O. Potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de linfoma histiocítico humano U937. Universidad Nacional de Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2012.
42. Nguyen A, Ho L, Wan Y. Chemotherapy and oncolytic virotherapy: advanced tactics in the war against cancer. *Frontiers in oncology*. 2014;4:145.
43. Ottolino-Perry K, Diallo J-S, Lichty BD, Bell JC, McCart JA. Intelligent design: combination therapy with oncolytic viruses. *Molecular Therapy*. 2010;18(2):251-63.
44. Carew J, Espitia C, Zhao W, Kelly K, Coffey M, Freeman JW, et al. Reolysin is a novel reovirus-based agent that induces endoplasmic reticular stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Cell death & disease*. 2013;4(7):e728.
45. Filippakis H, Spandidos DA, Sourvinos G. Herpesviruses: hijacking the Ras signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2010;1803(7):777-85.
46. Goetz C, Everson RG, Zhang LC, Gromeier M. MAPK signal-integrating kinase controls cap-independent translation and cell type-specific cytotoxicity of an oncolytic poliovirus. *Molecular Therapy*. 2010;18(11):1937-46.
47. Heo J, Breitbach CJ, Moon A, Kim CW, Patt R, Kim MK, et al. Sequential therapy with JX-594, a targeted oncolytic poxvirus, followed by sorafenib in hepatocellular carcinoma: preclinical and clinical demonstration of combination efficacy. *Molecular Therapy*. 2011;19(6):1170-9.
48. Guo ZS, Thorne SH, Bartlett DL. Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2008;1785(2):217-31.
49. Braidwood L, Graham SV, Graham A, Conner J. Oncolytic herpes viruses, chemotherapeutics, and other cancer drugs. *Oncolytic virotherapy*. 2013;2:57.
50. Liu T-C, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2007;4(2):101.
51. Sanjuán R, Grdzelišvili VZ. Evolution of oncolytic viruses. *Current opinion in virology*. 2015;13:1-5.
52. Le Bœuf F, Bell JC. United virus: the oncolytic tag-team against cancer! *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(2-3):205-11.
53. Russell SJ, Peng K-W, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nature biotechnology*. 2012;30(7):658.
54. Ilkow CS, Swift SL, Bell JC, Diallo J-S. From scourge to cure: tumour-selective viral pathogenesis as a new strategy against cancer. *PLoS pathogens*. 2014;10(1):e1003836.
55. Motalleb G. Virotherapy in cancer. *Iranian journal of cancer prevention*. 2013;6(2):101.
56. McCormick F KW. *Gene Therapy and Oncolytic Viruses* [Internet]. Elsevier Inc: Elsevier Inc; 2008 [Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-4066-6.00054-8>].
57. Cherubini G, Kallin C, Mozetic A, Hammaren-Busch K, Müller H, Lemoine N, et al. The oncolytic adenovirus Ad $\Delta\Delta$ enhances selective cancer cell killing in combination with DNA-damaging drugs in pancreatic cancer models. *Gene therapy*. 2011;18(12):1157.
58. Engeland CE, Grossardt C, Veinalde R, Bossow S, Lutz D, Kaufmann JK, et al. CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Molecular Therapy*. 2014;22(11):1949-59.
59. Rajecki M, Hällström Ta, Hakkarainen T, Nokisalmi P, Hautaniemi S, Nieminen AI, et al. Mre11 inhibition by oncolytic adenovirus associates with autophagy and underlies synergy with ionizing radiation. *International journal of cancer*. 2009;125(10):2441-9.
60. Bourke M, Salwa S, Harrington K, Kucharczyk M, Forde P, de Kruijf M, et al. The emerging role of viruses in the treatment of solid tumours. *Cancer treatment reviews*. 2011;37(8):618-32.
61. Wollmann G, Ozduman K, van den Pol AN. Oncolytic virus therapy of glioblastoma multiforme—concepts and candidates. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2012;18(1):69.
62. Marchini A, Scott E, Rommelaere J. Overcoming barriers in oncolytic virotherapy with HDAC inhibitors and immune checkpoint blockade. *Viruses*. 2016;8(1):9.

63. Zemp FJ, Corredor JC, Lun X, Muruve DA, Forsyth PA. Oncolytic viruses as experimental treatments for malignant gliomas: using a scourge to treat a devil. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(2-3):103-17.
64. Alvarez-Breckenridge CA, Yu J, Kaur B, Caligiuri MA, Chiocca EA. Deciphering the multifaceted relationship between oncolytic viruses and natural killer cells. *Advances in virology*. 2012;2012.
65. Alvarez-Breckenridge CA, Yu J, Price R, Wojton J, Pradarelli J, Mao H, et al. NK cells impede glioblastoma virotherapy through NKp30 and NKp46 natural cytotoxicity receptors. *Nature medicine*. 2012;18(12):1827.
66. Sobol PT, Boudreau JE, Stephenson K, Wan Y, Lichty BD, Mossman KL. Adaptive antiviral immunity is a determinant of the therapeutic success of oncolytic virotherapy. *Molecular Therapy*. 2011;19(2):335-44.
67. Kohlhapp FJ, Kaufman HL. Molecular pathways: mechanism of action for talimogene laherparepvec, a new oncolytic virus immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(5):1048-54.
68. Bommareddy PK, Shettigar M, Kaufman HL. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(8):498.
69. Bell J, McFadden G. Viruses for tumor therapy. *Cell host & microbe*. 2014;15(3):260-5.
70. Agency EM. International conference on harmonization of Considerations Oncolytic Viruses. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2009;6(3):185.
71. Dean W. G. Harron BSc P, FRPharmS, MPSNI. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: the ICH Process. *The Textbook of Pharmaceutical Medicine* 2009. p. 522-33.
72. Matthijssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Archives of virology*. 2011;156(8):1397-413.
73. Hu L, Crawford SE, Hyser JM, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Current opinion in virology*. 2012;2(4):380-8.
74. Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS. The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nature reviews Microbiology*. 2014;12(11):739-49.
75. Arias CF, Silva-Ayala D, Lopez S. Rotavirus entry: a deep journey into the cell with several exits. *J Virol*. 2015;89(2):890-3.
76. Hu L, Ramani S, Czako R, Sankaran B, Yu Y, Smith DF, et al. Structural basis of glycan specificity in neonate-specific bovine-human reassortant rotavirus. *Nature communications*. 2015;6:8346.
77. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*. 2012;485(7397):256-9.
78. Dormitzer PR, Sun ZY, Blixt O, Paulson JC, Wagner G, Harrison SC. Specificity and affinity of sialic acid binding by the rhesus rotavirus VP8* core. *J Virol*. 2002;76(20):10512-7.
79. Dormitzer PR, Sun ZY, Wagner G, Harrison SC. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *The EMBO journal*. 2002;21(5):885-97.
80. Zarate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias CF, Lopez S. Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology*. 2000;278(1):50-4.
81. Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(10):5389-94.
82. Graham KL, Fleming FE, Halasz P, Hewish MJ, Nagesha HS, Holmes IH, et al. Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *The Journal of general virology*. 2005;86(Pt 12):3397-408.
83. Hewish MJ, Takada Y, Coulson BS. Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *Journal of virology*. 2000;74(1):228-36.

84. Graham KL, Halasz P, Tan Y, Hewish MJ, Takada Y, Mackow ER, et al. Integrin-using rotaviruses bind alpha2beta1 integrin alpha2 I domain via VP4 DGE sequence and recognize alphaXbeta2 and alphaVbeta3 by using VP7 during cell entry. *J Virol.* 2003;77(18):9969-78.
85. Zárate S, Cuadras MA, Espinosa R, Romero P, Juárez KO, Camacho-Nuez M, et al. Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5. *Journal of virology.* 2003;77(13):7254-60.
86. Calderon MN, Guerrero CA, Acosta O, Lopez S, Arias CF. Inhibiting rotavirus infection by membrane-impermeant thiol/disulfide exchange blockers and antibodies against protein disulfide isomerase. *Intervirology.* 2012;55(6):451-64.
87. Calderón MN, Guzmán F, Acosta O, Guerrero CA. Rotavirus VP4 and VP7-derived synthetic peptides as potential substrates of protein disulfide isomerase lead to inhibition of rotavirus infection. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics.* 2012;18(4):373-82.
88. Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J, et al. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *Journal of virology.* 2012;86(18):9899-910.
89. Torres-Flores JM, Silva-Ayala D, Espinoza MA, López S, Arias CF. The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology.* 2015;475:172-8.
90. Graham KL, Halasz P, Tan Y, Hewish MJ, Takada Y, Mackow ER, et al. Integrin-using rotaviruses bind $\alpha 2 \beta 1$ integrin $\alpha 2$ I domain via VP4 DGE sequence and recognize $\alpha X \beta 2$ and $\alpha V \beta 3$ by using VP7 during cell entry. *Journal of virology.* 2003;77(18):9969-78.
91. Pérez-Vargas J, Romero P, López S, Arias CF. The peptide-binding and ATPase domains of recombinant hsc70 are required to interact with rotavirus and reduce its infectivity. *Journal of virology.* 2006;80(7):3322-31.
92. Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol.* 2004;78(5):2310-8.
93. Gutiérrez M, Isa P, Sánchez-San Martin C, Pérez-Vargas J, Espinosa R, Arias CF, et al. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology.* 2010;84(18):9161-9.
94. McDonald SM, Patton JT. Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome. *Trends in microbiology.* 2011;19(3):136-44.
95. Trujillo-Alonso V, Maruri-Avidal L, Arias CF, López S. Rotavirus infection induces the unfolded protein response of the cell and controls it through the nonstructural protein NSP3. *Journal of virology.* 2011;85(23):12594-604.
96. Guerrero CA, Acosta O. Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. *World journal of virology.* 2016;5(2):38.
97. Superti F, Ammendolia MG, Tinari A, Bucci B, Giammarioli AM, Rainaldi G, et al. Induction of apoptosis in HT-29 cells infected with SA-11 rotavirus. *Journal of medical virology.* 1996;50(4):325-34.
98. Chaïbi C, Cotte-Laffitte J, Sandré C, Esclatine A, Servin AL, Quéro A-M, et al. Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology.* 2005;332(2):480-90.
99. Martin-Latil S, Mousson L, Autret A, Colbère-Garapin F, Blondel B. Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway. *Journal of virology.* 2007;81(9):4457-64.
100. Bagchi P, Nandi S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M. Molecular mechanism behind rotavirus NSP1-mediated PI3 kinase activation: interaction between NSP1 and the p85 subunit of PI3 kinase. *Journal of virology.* 2013;87(4):2358-62.
101. Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Nayak MK, Chawla-Sarkar M. Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53. *Journal of virology.* 2013;87(12):6840-50.
102. Bhowmick R, Halder UC, Chattopadhyay S, Chanda S, Nandi S, Bagchi P, et al. Rotaviral enterotoxin nonstructural protein 4 targets mitochondria for activation of apoptosis during infection. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(42):35004-20.

103. Goodarzi Z, Soleimanjahi H, Arefian E, Saberfar E. The effect of bovine rotavirus and its nonstructural protein 4 on ER stress-mediated apoptosis in HeLa and HT-29 cells. *Tumor Biology*. 2016;37(3):3155-61.
104. Holloway G, Johnson RI, Kang Y, Dang VT, Stojanovski D, Coulson BS. Rotavirus NSP6 localizes to mitochondria via a predicted N-terminal α -helix. *The Journal of general virology*. 2015;96(12):3519-24.
105. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
106. Wong AS, Auersperg N. Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer. *Reproductive biology and endocrinology*. 2003;1(1):70.
107. Karst AM, Drapkin R. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *Journal of oncology*. 2010;2010.
108. Auersperg N, Wong AS, Choi K-C, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine reviews*. 2001;22(2):255-88.
109. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, Bhaskar V, Kistner EO, Tretiakova M, et al. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via α 5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer research*. 2008;68(7):2329-39.
110. Erickson BK, Conner MG, Landen Jr CN. The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2013;209(5):409-14.
111. Prat J, Oncology FCoG. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2014;124(1):1-5.
112. LD G. Carcinogénesis de Ovario. . *Fundacion Universitaria de Ciencias de la Salud*.
113. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, et al. Histological classification of ovarian cancer. *Medical Electron Microscopy*. 2003;36(1):9-17.
114. Strauss R, Li Z-Y, Liu Y, Beyer I, Persson J, Sova P, et al. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS one*. 2011;6(1):e16186.
115. De Franceschi N, Hamidi H, Alanko J, Sahgal P, Ivaska J. Integrin traffic—the update. *J Cell Sci*. 2015;128(5):839-52.
116. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in cell biology*. 2015;25(4):234-40.
117. Foubert P, Varner JA. Integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Integrin and Cell Adhesion Molecules: Springer*; 2011. p. 471-86.
118. Skubitz AP, Bast Jr RC, Wayner EA, Letourneau PC, Wilke MS. Expression of alpha 6 and beta 4 integrins in serous ovarian carcinoma correlates with expression of the basement membrane protein laminin. *The American journal of pathology*. 1996;148(5):1445.
119. Moss NM, Barbolina MV, Liu Y, Sun L, Munshi HG, Stack MS. Ovarian cancer cell detachment and multicellular aggregate formation are regulated by membrane type 1 matrix metalloproteinase: a potential role in *Ip* metastatic dissemination. *Cancer research*. 2009;69(17):7121-9.
120. Gao J, Hu Z, Liu D, Liu J, Liu C, Hou R, et al. Expression of Lewis y antigen and integrin α v, β 3 in ovarian cancer and their relationship with chemotherapeutic drug resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2013;32(1):36.
121. Goldberg I, Davidson B, Reich R, Gotlieb WH, Ben-Baruch G, Bryne M, et al. α v integrin expression is a novel marker of poor prognosis in advanced-stage ovarian carcinoma. *Clinical cancer research*. 2001;7(12):4073-9.
122. Hapke S, Kessler H, Luber B, Bengel A, Hutzler P, Höfler H, et al. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin α v β 3/vitronectin interaction. *Biological chemistry*. 2003;384(7):1073-83.
123. Partheen K, Levan K, Österberg L, Claesson I, Sundfeldt K, Horvath G. External validation suggests Integrin beta 3 as prognostic biomarker in serous ovarian adenocarcinomas. *BMC cancer*. 2009;9(1):336.
124. Landen CN, Kim T-J, Lin YG, Merritt WM, Kamat AA, Han LY, et al. Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of α v β 3 integrin in ovarian cancer. *Neoplasia*. 2008;10(11):1259-67.

125. Kaur S, Kenny HA, Jagadeeswaran S, Zillhardt MR, Montag AG, Kistner E, et al. β 3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer. *The American journal of pathology*. 2009;175(5):2184-96.
126. Ahmed N, Riley C, Rice GE, Quinn MA, Baker MS. α β 6 integrin-A marker for the malignant potential of epithelial ovarian cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2002;50(10):1371-9.
127. Banerjee S, Gore M. The future of targeted therapies in ovarian cancer. *The oncologist*. 2009;14(7):706-16.
128. Creekmore AL, Silkworth WT, Cimini D, Jensen RV, Roberts PC, Schmelz EM. Changes in gene expression and cellular architecture in an ovarian cancer progression model. *PLoS one*. 2011;6(3):e17676.
129. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS medicine*. 2008;5(12):e232.
130. Dobbin ZC, Katre AA, Steg AD, Erickson BK, Shah MM, Alvarez RD, et al. Using heterogeneity of the patient-derived xenograft model to identify the chemoresistant population in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014;5(18):8750.
131. Correa RJ, Komar M, Tong JG, Sivapragasam M, Rahman MM, McFadden G, et al. Myxoma virus-mediated oncolysis of ascites-derived human ovarian cancer cells and spheroids is impacted by differential AKT activity. *Gynecologic oncology*. 2012;125(2):441-50.
132. Hartkopf AD, Fehm T, Wallwiener D, Lauer U. Oncolytic virotherapy of gynecologic malignancies. *Gynecologic oncology*. 2011;120(2):302-10.
133. Li S, Tong J, Rahman MM, Shepherd TG, McFadden G. Oncolytic virotherapy for ovarian cancer. *Oncolytic Virother*. 2012;1:1-21.
134. Lau M-T, So W-K, Leung PC. Integrin β 1 mediates epithelial growth factor-induced invasion in human ovarian cancer cells. *Cancer letters*. 2012;320(2):198-204.
135. Zhao M, Ding J, Zeng K, Zhao J, Shen F, Yin Y, et al. Heat shock protein 27: a potential biomarker of peritoneal metastasis in epithelial ovarian cancer? *Tumor Biology*. 2014;35(2):1051-6.
136. Zhao M, Shen F, Yin Y, Yang Y, Xiang D, Chen Q. Increased expression of heat shock protein 27 correlates with peritoneal metastasis in epithelial ovarian cancer. *Reproductive Sciences*. 2012;19(7):748-53.
137. Kimura E, Enns RE, Alcaraz JE, Arboleda J, Slamon DJ, Howell SB. Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kD heat-shock protein HSP-60. *Journal of clinical oncology*. 1993;11(5):891-8.
138. Elstrand MB, Kleinberg L, Kohn EC, Tropé CG, Davidson B. Expression and clinical role of antiapoptotic proteins of the bag, heat shock, and Bcl-2 families in effusions, primary tumors, and solid metastases in ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2009;28(3):211-21.
139. Maes P, Matthijssens J, Rahman M, Van Ranst M. RotaC: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC microbiology*. 2009;9(1):238.
140. Davola ME, Mossman KL. Oncolytic viruses: how “lytic” must they be for therapeutic efficacy? *Oncoimmunology*. 2019;8(6):e1581528.
141. Peruzzi P, Chiocca EA. Viruses in cancer therapy—from benchwarmers to quarterbacks. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15(11):657.
142. Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat shock proteins and cancer. *Trends in pharmacological sciences*. 2017;38(3):226-56.
143. Vahid S, Thaper D, Zoubeidi A. Chaperoning the cancer: the proteostatic functions of the heat shock proteins in cancer. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 2017;12(1):35-47.
144. Ata R, Antonescu C. Integrins and cell metabolism: an intimate relationship impacting cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(1):189.
145. Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E, Blutt SE, Rice DA, Bergelson JM, et al. VLA-2 (α 2 β 1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *Journal of virology*. 2002;76(3):1109-23.

146. Raj P, Matson D, Coulson B, Bishop R, Taniguchi K, Urasawa S, et al. Comparisons of rotavirus VP7-typing monoclonal antibodies by competition binding assay. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):704-11.
147. Lin PH, Selinfreund R, Wakshull E, Wharton W. Rapid and efficient purification of plasma membrane from cultured cells: characterization of epidermal growth factor binding. *Biochemistry*. 1987;26(3):731-6.
148. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics*. 2017;18(1):529.
149. Díaz-Salinas MA, Romero P, Espinosa R, Hoshino Y, López S, Arias CF. The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. *Journal of virology*. 2013;87(3):1658-63.
150. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676.
151. Chazal N, Gerlier D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(2):226-37.
152. Iša P, Realpe M, Romero P, López S, Arias CF. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology*. 2004;322(2):370-81.
153. Dou X, Li Y, Han J, Zarlenga DS, Zhu W, Ren X, et al. Cholesterol of lipid rafts is a key determinant for entry and post-entry control of porcine rotavirus infection. *BMC veterinary research*. 2018;14(1):45.
154. Delmas O, Breton M, Sapin C, Le Bivic A, Colard O, Trugnan G. Heterogeneity of raft-type membrane microdomains associated with VP4, the rotavirus spike protein, in Caco-2 and MA 104 cells. *Journal of virology*. 2007;81(4):1610-8.
155. Isa P, Gutiérrez M, Arias CF, López S. Rotavirus cell entry. 2008.
156. Guerrero C, Moreno L. Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin $\alpha\beta 3$ are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells. *Acta virologica*. 2012;56(1):63-70.
157. Yuan C, Furlong J, Burgos P, Johnston LJ. The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophysical journal*. 2002;82(5):2526-35.
158. Zinchuk V, Zinchuk O. Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. *Current protocols in cell biology*. 2008;39(1):4.19. 1-4.. 6.
159. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2014;24(1).
160. Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*. 2010;8(1):31.
161. Bass DM, Baylor MR, Chen C, Mackow EM, Bremont M, Greenberg HB. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90(6):2313-20.
162. Chen D, Ramig RF. Rescue of infectivity by sequential in vitro transcapsidation of rotavirus core particles with inner capsid and outer capsid proteins. *Virology*. 1993;194(2):743-51.
163. Desselberger U, Richards J, Tchertanov L, Lepault J, Lever A, Burrone O, et al. Further characterisation of rotavirus cores: Ss (+) RNAs can be packaged in vitro but packaging lacks sequence specificity. *Virus research*. 2013;178(2):252-63.
164. Teimoori A, Soleimanjahi H, Makvandi M. Characterization and transferring of human rotavirus double-layered particles in MA104 cells. *Jundishapur journal of microbiology*. 2014;7(6).
165. Barro M, Patton JT. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(11):4114-9.
166. Graff JW, Mitzel DN, Weisend CM, Flenniken ML, Hardy ME. Interferon regulatory factor 3 is a cellular partner of rotavirus NSP1. *Journal of virology*. 2002;76(18):9545-50.

167. Carreño-Torres JJ, Gutiérrez M, Arias CF, López S, Isa P. Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. *Virology journal*. 2010;7(1):350.
168. Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(9):7607-16.
169. Sidera K, Patsavoudi E. Extracellular HSP90: conquering the cell surface. *Cell cycle*. 2008;7(11):1564-8.
170. Nimmervoll B, Chtcheglova LA, Juhasz K, Cremades N, Aprile FA, Sonnleitner A, et al. Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis. *FEBS letters*. 2015;589(19):2747-53.
171. Mahalka AK, Kirkegaard T, Jukola LT, Jäättelä M, Kinnunen PK. Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2014;1838(5):1344-61.
172. Botzler C, Li G, Issels RD, Multhoff G. Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell stress & chaperones*. 1998;3(1):6.
173. Reyes-del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of virology*. 2005;79(8):4557-67.
174. Zhu Y-Z, Cao M-M, Wang W-B, Wang W, Ren H, Zhao P, et al. Association of heat-shock protein 70 with lipid rafts is required for Japanese encephalitis virus infection in Huh7 cells. *Journal of general virology*. 2012;93(1):61-71.
175. Wang Y, Li Y, Ding T. Heat shock protein 90 β in the Vero cell membrane binds Japanese encephalitis virus. *International journal of molecular medicine*. 2017;40(2):474-82.
176. Triantafilou K, Fradelizi D, Wilson K, Triantafilou M. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *Journal of virology*. 2002;76(2):633-43.
177. Sagara Y, Ishida C, Inoue Y, Shiraki H, Maeda Y. 71-kilodalton heat shock cognate protein acts as a cellular receptor for syncytium formation induced by human T-cell lymphotropic virus type 1. *Journal of virology*. 1998;72(1):535-41.
178. Wampler JL, Kim K-P, Jaradat Z, Bhunia AK. Heat shock protein 60 acts as a receptor for the *Listeria* adhesion protein in Caco-2 cells. *Infection and immunity*. 2004;72(2):931-6.
179. Dziewanowska K, Carson AR, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Bohach GA. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. *Infection and immunity*. 2000;68(11):6321-8.
180. Speth C, Prohászka Z, Mair M, Stöckl G, Zhu X, Jöbstl B, et al. A 60 kD heat-shock protein-like molecule interacts with the HIV transmembrane glycoprotein gp41. *Molecular immunology*. 1999;36(9):619-28.
181. Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nature immunology*. 2001;2(4):338.
182. Barazi HO, Zhou L, Templeton NS, Krutzsch HC, Roberts DD. Identification of heat shock protein 60 as a molecular mediator of $\alpha 3\beta 1$ integrin activation. *Cancer research*. 2002;62(5):1541-8.
183. Armijo G, Okerblom J, Cauvi DM, Lopez V, Schlamadinger DE, Kim J, et al. Interaction of heat shock protein 70 with membranes depends on the lipid environment. *Cell Stress and Chaperones*. 2014;19(6):877-86.
184. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(1):31.
185. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2017;18(6):361.
186. Frédérick J-M, Rodgers JM, Willems TF, Smit B. Molecular simulation of the effect of cholesterol on lipid-mediated protein-protein interactions. *Biophysical journal*. 2010;99(11):3629-38.

187. Cuadras MA, Bordier BB, Zambrano JL, Ludert JE, Greenberg HB. Dissecting rotavirus particle-raft interaction with small interfering RNAs: insights into rotavirus transit through the secretory pathway. *Journal of virology*. 2006;80(8):3935-46.
188. Cuadras MA, Greenberg HB. Rotavirus infectious particles use lipid rafts during replication for transport to the cell surface in vitro and in vivo. *Virology*. 2003;313(1):308-21.
189. Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, et al. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *The EMBO journal*. 2001;20(9):2202-13.
190. Haselhorst T, Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, et al. Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion. *Nature chemical biology*. 2009;5(2):91.
191. Isa P, Arias CF, López S. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconjugate journal*. 2006;23(1-2):27-37.
192. Enouf V, Chwetzoff S, Trugnan G, Cohen J. Interactions of rotavirus VP4 spike protein with the endosomal protein Rab5 and the prenylated Rab acceptor PRA1. *Journal of virology*. 2003;77(12):7041-7.
193. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology*. 2009;11(5):510.
194. Halasz P, Holloway G, Coulson BS. Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection. *Journal of General Virology*. 2010;91(8):2007-18.
195. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016;66(1):7-30.
196. Network NCC. Ovarian Cancer Guidelines: available in <https://www.nccn.org/about/permissions/reference.aspx>; 2016 [consultado: 16/08/2019].
197. Lloyd KL, Cree IA, Savage RS. Prediction of resistance to chemotherapy in ovarian cancer: a systematic review. *BMC cancer*. 2015;15(1):117.
198. Leffers N, Lambeck AJ, Gooden MJ, Hoogeboom BN, Wolf R, Hamming IE, et al. Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial. *International Journal of Cancer*. 2009;125(9):2104-13.
199. Martin L, Schilder R. Novel approaches in advancing the treatment of epithelial ovarian cancer: the role of angiogenesis inhibition. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(20):2894-901.
200. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, et al. Niraparib maintenance therapy in platinum-sensitive, recurrent ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(2):2154-64.
201. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: the AURELIA open-label randomized phase III trial. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2014;69(7):402-4.
202. Galanis E, Atherton PJ, Maurer MJ, Knutson KL, Dowdy SC, Cliby WA, et al. Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer. *Cancer research*. 2015;75(1):22-30.
203. Kurman RJ, Shih I-M. The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer—a proposed unifying theory. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(3):433.
204. Vang R, Shih IM, Kurman RJ. Fallopian tube precursors of ovarian low- and high-grade serous neoplasms. *Histopathology*. 2013;62(1):44-58.
205. Bodelon C, Killian JK, Sampson JN, Anderson WF, Matsuno R, Brinton LA, et al. Molecular classification of epithelial ovarian cancer based on methylation profiling: evidence for survival heterogeneity. *Clinical Cancer Research*. 2019:clincanres. 3720.2018.
206. Narayanankutty V, Narayanankutty A, Nair A. Heat Shock Proteins (HSPs): A Novel Target for Cancer Metastasis Prevention. *Current drug targets*. 2019;20(7):727-37.
207. Tsai Y-P, Yang M-H, Huang C-H, Chang S-Y, Chen P-M, Liu C-J, et al. Interaction between HSP60 and β -catenin promotes metastasis. *Carcinogenesis*. 2009;30(6):1049-57.
208. Feng J, Xie G, Zhan Y, Lu J, Xu L, Fan S, et al. Elevated HSP 90 associates with expression of HIF-1 α and p-AKT and predicts the poor prognosis in the nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology*. 2019.

209. Klimczak M, Biecek P, Zylicz A, Zylicz M. Heat shock proteins create a signature to predict the clinical outcome in breast cancer. *Scientific reports*. 2019;9(1):7507.
210. Liu H, Xiao F, Serebriiskii IG, O'Brien SW, Maglaty MA, Astsaturov I, et al. Network analysis identifies an HSP90-central hub susceptible in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(18):5053-67.
211. ELPEK GÖ, KARAVELI Ş, ŞİMŞEK T, KELEŞ N, Aksoy NH. Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries: Correlation with clinicopathologic factors and survival. *Apmis*. 2003;111(4):523-30.
212. Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King R, Hawkins RA, Smyth JF, et al. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 1995;1(12):1603-9.
213. Annunziata CM, Kleinberg L, Davidson B, Berner A, Gius D, Tchabo N, et al. BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(22):6585-92.
214. Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Romero H, Marx D, Meden H. Immunohistochemical detection of HSP60-expression in human ovarian cancer. Correlation with survival in a series of 247 patients. *Anticancer research*. 1999;19(3A):2141-6.
215. Bodzek P, Partyka R, Damasiewicz-Bodzek A. Antibodies against Hsp60 and Hsp65 in the sera of women with ovarian cancer. *Journal of ovarian research*. 2014;7(1):30.
216. Calderwood SK. Heat shock proteins and cancer: intracellular chaperones or extracellular signalling ligands? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2017;373(1738):20160524.
217. Cohen M, Dromard M, Petignat P. Heat shock proteins in ovarian cancer: a potential target for therapy. *Gynecologic oncology*. 2010;119(1):164-6.
218. Marsico G, Russo L, Quondamatteo F, Pandit A. Glycosylation and Integrin Regulation in Cancer. *Trends in cancer*. 2018;4(8):537-52.
219. Casey RC, Burleson KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema Jr TR, Ruff LE, et al. β 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *The American journal of pathology*. 2001;159(6):2071-80.
220. Cruet-Hennequart S, Maubant S, Luis J, Gauduchon P, Staedel C, Dedhar S. α v integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2003;22(11):1688.
221. Mitra A, Sawada K, Tiwari P, Mui K, Gwin K, Lengyel E. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and α 5 β 1-integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene*. 2011;30(13):1566.
222. Cannistra SA, Ottensmeier C, Niloff J, Orta B, DiCarlo J. Expression and function of β 1 and α v β 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 1995;58(2):216-25.
223. Bartolazzi A, Kaczmarek J, Nicolo G, Risso A, Tarone G, Rossino P, et al. Localization of the alpha 3 beta 1 integrin in some common epithelial tumors of the ovary and in normal equivalents. *Anticancer research*. 1993;13(1):1-11.
224. Shield K, Riley C, Quinn MA, Rice GE, Ackland ML, Ahmed N. α 2 β 1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. *Journal of carcinogenesis*. 2007;6:11.
225. Liapis H, Adler LM, Wick MR, Rader JS. Expression of α v β 3 integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Human pathology*. 1997;28(4):443-9.
226. Organization WH, Research SPf, Diseases TiT, Diseases WHODOCoNT, Epidemic WHO, Alert P. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: World Health Organization; 2009.
227. Zárate S, Espinosa R, Romero P, Méndez E, Arias CF, López S. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *Journal of Virology*. 2000;74(2):593-9.
228. Shepherd TG, Thériault BL, Campbell EJ, Nachtigal MW. Primary culture of ovarian surface epithelial cells and ascites-derived ovarian cancer cells from patients. *Nature protocols*. 2006;1(6):2643.

229. Clark R, Krishnan V, Schoof M, Rodriguez I, Theriault B, Chekmareva M, et al. Milky spots promote ovarian cancer metastatic colonization of peritoneal adipose in experimental models. *The American journal of pathology*. 2013;183(2):576-91.
230. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(9):642-62.
231. Chaibi C, Cotte-Laffitte J, Sandre C, Esclatine A, Servin AL, Quero AM, et al. Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology*. 2005;332(2):480-90.
232. Martin-Latil S, Mousson L, Autret A, Colbere-Garapin F, Blondel B. Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Virol*. 2007;81(9):4457-64.
233. Corrado G, Salutari V, Palluzzi E, Distefano MG, Scambia G, Ferrandina G. Optimizing treatment in recurrent epithelial ovarian cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2017;17(12):1147-58.
234. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasm. *Journal of virology*. 2004;78(14):7763-74.
235. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai H-C, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer research*. 2008;68(11):4311-20.
236. Maru Y, Hippo Y. Current Status of Patient-Derived Ovarian Cancer Models. *Cells*. 2019;8(5):505.