



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral Wt1-5 en cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores B

Rafael Antonio Guerrero Rojas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología
Bogotá, Colombia

2018

Caracterización del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral Wt1-5 en cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores B

Rafael Antonio Guerrero Rojas

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Doctor en Biotecnología

Director:

Carlos Arturo Guerrero Fonseca. MD., MSc., PhD.

Co-Director:

Orlando Acosta Losada. BSc., MSc., PhD.

Línea de Investigación:

Virus Oncolíticos

Grupo de investigación de Biología Molecular de Virus

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Doctorado en Biotecnología

Bogotá, Colombia

2018

(Dedicatoria)

A mis Padres.

Por darme la libertad de elegir mi futuro y brindarme con las manos abiertas su apoyo y confianza en mi preparación. Porque recibo una de sus más valiosas herencias: mi profesión. Por ustedes la obtuve y a ustedes se las brindo. Gracias por todo.

A mi Maestro.

He recibido un honor demasiado grande, sin usted, sin la mano afectuosa que me ha tendido, sin su enseñanza y su ejemplo, no hubiese sucedido nada de todo esto. Sus esfuerzos, su trabajo y el corazón generoso que usted puso en ello continúan siempre vivos en este su alumno agradecido.

“Un sabio dijo: Por más consejos que te den, hay lecciones que solo aprenderás a base golpes y caídas”

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con la colaboración de los miembros del Grupo de Investigación de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y el apoyo del Servicio de Oncohematología de la Fundación Hospital de la Misericordia-HOMI.

Agradezco profundamente a mi Director de tesis, el Dr. Carlos Arturo Guerrero Fonseca quien con su capacidad y experiencia me ha brindado la oportunidad de aprender acerca de la vida, la ciencia y la investigación. Profesor gracias por el rigor, la inspiración, el ejemplo, la guía personal e intelectual, por permitir equivocarme y por la libertad científica que generosamente inculca.

Agradezco a mi Co-director, el Dr. Orlando Acosta Losada por su enseñanza a través del dialogo reflexivo y metódico. Profesor gracias por sus aportes científicos y técnicos y su interlocución permanente de tan alta calidad intelectual.

Agradezco inmensamente a los miembros del equipo de Oncohematología del HOMI., a la Dra. Adriana Linares Ballesteros, a la Dra. Isabel Cristina Sarmiento Urbina, a la Dra. Gloria Inés Uribe Botero, a la Dra. Francly Helena Ortiz Baquero, al Dr. Carlos Alberto Pardo González, Al Dr. Eduardo Humberto Beltrán Dussan, al Dr. Edgar Vladimir Cabrera Bernal y al Dr. Agustín Darío Contreras Acosta, quienes colaboraron incondicionalmente con la recolección de muestras, nos brindaron asesoría y fueron grandes maestros durante mi corta estancia en el HOMI.

Agradezco a los pacientes donantes de las muestras de sangre y a sus padres por consentir su participación en el proyecto.

Agradezco a los profesores Dr. Carlos Alberto Parra López y Dr. Juan José Yunis por sus aportes como parte de mi comité tutorial.

A los compañeros del laboratorio de Biología Molecular de Virus que en medio de nuestra odisea han sido un apoyo en las discusiones científicas.

Agradezco al Programa interfacultades Doctorado en Biotecnología por permitir realizar mi formación, especialmente a la Dra. Sonia Amparo Ospina y a Raquel Noguera

Agradezco a mis padres y a mi hermano que con un gran esfuerzo y sacrificio me han brindado las condiciones para realizar mi formación, quienes han sido mis primeros maestros, mi mayor ejemplo de constancia, bondad y amor. Les debo la persona que soy a mis amorosos padres que nunca se rindieron y hoy ven forjado un anhelo y una ilusión. Gracias a Yany por su amor incondicional y su paciencia.

Agradezco a COLCIENCIAS por la financiación del proyecto a través del Programa Nacional de Ciencia, tecnología e innovación en salud en la convocatoria de proyectos número 715 de 2015 (110171250829).

Resumen

ANTECEDENTES: El cáncer es un importante problema de salud que plantea un gran desafío para los sistemas de atención de salud en todo el mundo. Las herramientas para el tratamiento del cáncer han avanzado rápidamente en los últimos años, dando como resultado nuevas estrategias terapéuticas alternativas y complementarias al tratamiento convencional.

OBJETIVOS: Identificar el potencial oncolítico del rotavirus Wt1-5 adaptado a células tumorales y algunos de los receptores de superficie celular utilizados por el rotavirus Wt1-5 y los marcadores de muerte celular inducidos por la infección en células de leucemia linfoblástica aguda de precursores B y células Reh.

MÉTODOS: Se usó el aislamiento de rotavirus Wt1-5 recientemente adaptado a células tumorales, para infectar las células de leucemia linfoblástica aguda de precursores B y las células Reh. La infección por rotavirus Wt1-5 fue seguida mediante análisis de antígenos virales por citometría de flujo. Se evaluaron algunas proteínas de superficie celular como posibles receptores y marcadores de muerte celular inducidos por la infección viral.

RESULTADOS: El presente estudio mostró que el rotavirus Wt1-5 fue capaz de utilizar las proteínas de la superficie celular como las proteínas de choque térmico Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$. El rotavirus Wt1-5 indujo efectos citotóxicos que incluyen cambios en la permeabilidad de la membrana celular, alteración del potencial de membrana mitocondrial, fragmentación del DNA y activación de la señalización de la muerte celular.

CONCLUSIONES PRINCIPALES: Concluimos que el rotavirus Wt1-5 puede ser un candidato potencial para ser utilizado como un agente oncolítico y que la apoptosis podría ser un mecanismo por el cual Wt1-5 mata las células de leucemia linfoblástica aguda de precursores B y las células Reh.

Palabras clave: Rotavirus, Virus oncolíticos; Leucemia linfoblástica aguda; proteínas de choque térmico; PDI; Integrina $\beta 3$.

Abstract

BACKGROUND: Cancer is a major health problem that poses a great challenge to health care systems around the world. Current tools for cancer treatment have advanced rapidly in recent years, resulting in new alternative and complementary therapeutic strategies to conventional treatment.

OBJECTIVES: Work aims to identify the oncolytic potential of rotavirus Wt1-5 adapted to tumor cells, in addition, to establish the cell surface receptors and markers of cell death induced by rotavirus infection in B- cell acute lymphoblastic leukemia cells and Reh cells. We used Wt1 -5 rotavirus isolate recently adapted to tumor cells, to infect the B- cell acute lymphoblastic leukemia cells and Reh cells.

METHODS: We assessed rotavirus infection by viral antigens detection through flow cytometry analysis. Also, we analyze some cell surface proteins and cell death markers induced by viral infection.

RESULTS: The assays showed that rotavirus Wt1 -5 was able to use cell-surface proteins such as heat shock proteins Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI, and β 3 integrin. Rotavirus Wt1-5 induced cytotoxic effects including changes in cell membrane permeability, alteration of mitochondrial membrane potential, DNA fragmentation, and activation of cell death signaling.

MAIN CONCLUSIONS: We conclude that rotavirus Wt1 -5 may be a potential candidate to be used as an oncolytic agent. This rotavirus could induce apoptosis as a cell death mechanism in B- cell acute lymphoblastic leukemia cells and Reh cells.

Keywords: Rotavirus; Oncolytic viruses; Acute lymphoblastic leukemia; heat shock proteins; PDI, Integrin- β 3.

Contenido

	Pág.
Agradecimientos.....	VII
Resumen.....	XI
Abstract.....	XII
Listado de ilustraciones.....	XVII
Listado de figuras.....	XVIII
Lista de tablas.....	XX
Lista de abreviaturas.....	XXI
Introducción.....	1
Contenido	
1. Capítulo 1. Estado del arte.....	3
1.1 Virus oncolíticos.....	3
1.1.1 Virus oncolíticos de DNA seleccionados en el laboratorio y utilizados en la clínica.....	7
1.1.2 Virus oncolíticos de RNA seleccionados en el laboratorio y utilizados en la clínica.....	8
1.1.3 Consideraciones a tener en cuenta según “the international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ich)” para el diseño de terapias contra el cáncer basadas en virus oncolíticos (emea/chmp/ich/607698/2008).....	10
1.2 Rotavirus.....	14
1.2.1 Características generales de los rotavirus.....	14
1.2.2 Genoma.....	15
1.2.3 Características de las proteínas virales.....	16
1.2.4 Clasificación.....	20
1.2.5 Epidemiología.....	21
1.2.6 Interacción virus-célula: adsorción y penetración.....	23
1.2.7 Ciclo de infección.....	25
1.2.8 Estabilidad y viabilidad del rotavirus.....	26
1.2.9 Riesgos de laboratorio.....	27
1.2.10 Control de exposición / protección personal.....	27
1.3 Proteínas de choque térmico.....	28
1.3.1 Generalidades de las HSPs.....	28
1.3.2 Familias de las HSPs.....	29
1.3.3 Relación de HSPs y cáncer.....	31
1.4 Integrina $\beta 3$	33
1.4.1 Generalidades de las integrinas.....	33
1.4.2 Estructura de las integrinas.....	34
1.4.3 $\alpha\beta 3$ integrina y cáncer.....	35
1.5 Proteína disulfuro isomerasa (PDI).....	36
1.5.1 Generalidades de la PDI.....	36
1.5.2 Estructura de la PDI. (EC 5.3.4.1).....	37
1.5.3 PDI de la superficie celular.....	38
1.5.4 PDI y cáncer.....	40
1.6 Leucemia linfoblástica aguda.....	41
1.6.1 Generalidades.....	41
1.6.2 Epidemiología.....	41
1.6.3 Etiopatogenia.....	42
1.6.4 Manifestaciones clínicas de la leucemia linfoblástica B aguda (LLA-B).....	43
1.6.5 Clasificación.....	44
1.6.6 Diagnóstico de la leucemia linfoblástica B.....	45
1.6.7 Estratificación del riesgo y establecimiento del pronóstico.....	48
1.6.8 Tratamiento.....	49

1.7	Línea celular Reh	51
2.	Capítulo 2. Marco contextual	53
2.1	Antecedentes	53
2.2	Formulación del problema.....	55
2.3	Justificación	56
2.4	Objetivos.....	56
2.4.1	Objetivo general	56
2.4.2	Objetivos específicos	57
3.	Capítulo 3. Materiales y métodos	59
3.1	Diseño	59
3.1.1	Universo	59
3.1.2	Muestra.....	59
3.1.3	Selección de casos	60
3.1.4	Línea celular	61
3.1.5	Stock de rotavirus.....	62
3.1.6	Titulación de rotavirus	62
3.1.7	Inactivación del rotavirus por irradiación UV	62
3.1.8	Análisis del dsRNA rotaviral	63
3.1.9	Infección de las células	63
3.1.10	Ensayo de re-Infección de la línea tumoral Reh para determinación del ciclo infeccioso	64
3.1.11	Inmunocitoquímica para evaluación de la expresión de antígenos rotavirales en las células Reh.....	64
3.1.12	Citometría de flujo para evaluación de la expresión de antígenos rotavirales en las células Reh.....	65
3.1.13	ELISA de captura para evaluación de presencia de antígenos rotavirales en el sobrenadante del cultivo	65
3.1.14	Viabilidad celular con azul de tripan.....	66
3.1.15	Ensayos de proliferación celular con Cell Tracker	66
3.1.16	Evaluación de lisis celular con LDH	67
3.1.17	Evaluación del efecto citotóxico a nivel metabólico con Resazurina	68
3.1.18	Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) con DiOC6(3) y de la permeabilidad de membrana citoplasmática con 7-AAD	68
3.1.19	Evaluación de la expresión de Caspasa 8 y 3	69
3.1.20	Evaluación de la fragmentación del DNA mediante ensayo de TUNEL	69
3.1.21	Evaluación de la fragmentación del DNA mediante electroforesis	70
3.1.22	Evaluación de la expresión de la Poli ADP- Ribosa Polimerasa (PARP) mediante inmunofluorescencia	72
3.1.23	Caracterización de la expresión de proteínas de membrana	73
3.1.24	Ensayo de co-localización de antígenos virales con las proteínas de membrana mediante microscopía confocal.....	73
3.1.25	Ensayo de bloqueo.....	74
3.1.26	Ensayo de RT-PCR.....	75
3.1.27	Identificación de genotipos del aislamiento Wt1-5 por PCR semi-anidada	76
4.	Capítulo 4. Resultados.....	77
4.1	Infección de células Reh por el rotavirus Wt1-5.....	77
4.2	Efectos de la inoculación con el rotavirus Wt1-5 sobre la viabilidad celular y la permeabilidad de la membrana celular	81
4.3	Efecto de la infección por el rotavirus Wt1-5 sobre la actividad redox, el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la permeabilidad de la membrana celular.....	84
4.4	Inducción de marcadores de muerte celular debido a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado	88
4.5	Inducción de la fragmentación del DNA por la infección con el rotavirus Wt1-5	92

4.6	Proteínas de superficie celular e infección por el rotavirus Wt1-5.....	93
4.7	Colocalización de las proteínas HSPs, PDI y β 3 con antígenos estructurales del rotavirus Wt1-5	96
4.8	Descripción de la cohorte de pacientes en edad pediátrica diagnosticados con leucemia linfoblástica LLA-B donantes de las muestras de sangre periférica para la recuperación de linfoblastos.	98
4.9	Evaluación de la susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado en linfoblastos LLA-B y en las PBMCs del grupo control sano.....	103
4.10	Efectos de la inoculación con el rotavirus Wt1-5 sobre la viabilidad celular y la permeabilidad de la membrana celular.....	106
4.11	Análisis de infectividad del rotavirus Wt1-5 adaptado sobre linfoblastos LLA-B y en PBMCs.....	108
4.12	Análisis de la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, β 3 y PDI en la membrana citoplasmática de los linfoblastos LLA-B y de las PBMCs.....	111
4.13	Correlación entre expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, β 3 y PDI con los % de infección y muerte celular de los linfoblastos LLA-B y las PBMCs.....	114
	117
4.14	Análisis multivariado de las muestras de linfoblastos LLA-B y PBMCs.....	118
4.15	Caracterización electroferotípica y genotípica del rotavirus Wt1-5 adaptado.	120
4.16	Análisis filogenético del rotavirus Wt1-5 adaptado.....	123
5.	Capítulo 5. Discusión.....	129
6.	Conclusiones y recomendaciones.....	137
6.1	Conclusiones.....	137
6.2	Recomendaciones.....	138
 Anexos		
	Anexo 1. Lista de Primer Genotipificación.....	139
	Anexo 2. Secuencias del rotavirus Wt1-5 adaptado.....	141
	Anexo 3. Análisis de alineamiento múltiple con cepas de referencia Wa, Wi, 69M, RRV, UK, YM y OSU.....	143
	Anexo 4. Documento de consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras de sangre periférica.....	155
	Anexo 5. Documento de asentimiento informado para la donación voluntaria de muestras de sangre periférica en menores de edad.....	159
	Anexo 6. Certificado participación congreso internacional “2nd World Congress on Cancer Research and Therapy” Octubre 02-04 de 2017. San Diego CA, USA.....	163
	Anexo 7. Certificado participación congreso “III congreso latinoamericano de Virología, VII Simposio Nacional de Virología” 30 de Noviembre al 02 de Diciembre de 2017. Medellín, Colombia.....	165
	Anexo 8. Certificado participación Simposio “Primer simposio de investigación de posgrados en - Biotecnología” 17 al 19 de Octubre de 2017. Medellín, Colombia.....	167
	Anexo 9. Artículo publicado. “Quantifyng rotavirus kinetics in the Reh tumor cell line using in vitro data”.....	169
	Anexo 10. Artículo sometido. “Assessing the oncolytic potential of rotavirus on mouse myeloma cell line Sp2/0-Ag14”.....	171
	Anexo 11. Artículo sometido. “Oncolytic effect of rotavirus Wt1-5 in the human acute lymphoblastic leukemia cell line Reh”.....	173
	 Bibliografía.....	175

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Mecanismo de oncolisis selectiva.....	4
Ilustración 2. Estructura morfológica del rotavirus.	15
Ilustración 3. Segmentos genómicos rotavirales.....	16
Ilustración 4. Organización de las proteínas estructurales rotavirales.....	17
Ilustración 5. Clasificación del rotavirus.	21
Ilustración 6. Estructura general de las Integrinas.....	35
Ilustración 7. Estructura de PDI.....	38

Lista de figuras

Figura 1. La línea celular Reh es susceptible a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado.	80
Figura 2. El rotavirus Wt1-5 adaptado disminuye la viabilidad celular y produce alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular.	85
Figura 3. La infección por rotavirus Wt1-5 afecta la actividad oxidorreductiva mitocondrial e induce una caída de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y permeabilidad de la membrana citoplasmática en la línea celular Reh.	89
Figura 4. La inoculación con el rotavirus Wt1-5 adaptado induce señales relacionadas con muerte celular en la línea celular Reh.	91
Figura 5. Las células Reh inoculadas con el rotavirus Wt1-5 adaptado presentan fragmentación nuclear.	94
Figura 6. Reducción de la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado al incubar las células Reh con anticuerpos específicos contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI y $\beta 3$	97
Figura 7. Colocalización de las proteínas celulares Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI y $\beta 3$ y proteínas estructurales del rotavirus Wt1-5 adaptado.	99
Figura 8. Descripción de las principales variables clínicas de la población de muestras de linfoblastos obtenidos de sangre periférica de pacientes en edad pediátrica diagnosticados con leucemia linfoblástica LLA-B.	102
Figura 9. Evaluación de la susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado en linfoblastos LLA-B obtenidos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico confirmado de LLA-B que no han iniciado tratamiento y en las PBMCs del grupo control.	105
Figura 10. Evaluación de la viabilidad celular luego de la inoculación con el rotavirus Wt1-5 adaptado en linfoblastos LLA-B y en las PBMCs del grupo control sano luego de 24.h.p.i.	108
Figura 11. Análisis de infectividad del rotavirus Wt1-5 adaptado en linfoblastos LLA-B obtenidos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico confirmado de LLA-B que no han iniciado tratamiento y en PBMCs obtenidas del grupo control sano.	110
Figura 12. Análisis de la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, $\beta 3$ y PDI en la membrana citoplasmática de las PBMCs del grupo control sano y Ptes LLA-B que no han iniciado tratamiento.	113
Figura 13. Análisis de correlación múltiple entre la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, $\alpha\beta 3$ y PDI con los % de infección y muerte celular los linfoblastos LLA-B.	116
Figura 14. Análisis de correlación múltiple entre la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, $\alpha\beta 3$ y PDI con los % de infección y muerte celular de las PBMCs del grupo control sano.	117
Figura 15. Análisis multivariado de las muestras de linfoblastos LLA-B y PBMCs.	121
Figura 16. Caracterización electroferotípica y genotípica del rotavirus Wt1-5 adaptado.	124
Figura 17. Análisis filogenético del rotavirus Wt1-5 adaptado.	126

Lista de tablas

Tabla 1. Virus actualmente implementados en terapia contra el cáncer.....	5
Tabla 2. Virus usados actualmente en ensayos clínicos.....	8
Tabla 3. Ejemplos de ensayos clínicos para viroterapia oncolítica.....	9
Tabla 4. Receptores celulares asociados a la infección rotaviral.....	25
Tabla 5. Familia de las proteínas de choque térmico (HSPs).....	31
Tabla 6. Síntomas de presentación de LLA.....	44
Tabla 7. Clasificación FAB de la LLA.....	45
Tabla 8. Clasificación de la OMS para leucemias de precursores linfoides.....	45
Tabla 9. Medicamentos empleados en la terapéutica de la LLA.....	50
Tabla 10. Lista de Variables evaluadas.....	61
Tabla 11. Datos clínicos de las muestras de linfoblastos LLA-B.....	103
Tabla 12. Resultados de laboratorio de las muestras de linfoblastos LLA-B inoculados con rotavirus Wt1-5 luego de 24 h.p.i.....	122
Tabla 13. Resultados de laboratorio de las PBMCs del grupo control sano inoculadas con rotavirus Wt1-5 luego de 24 h.p.i.....	122

Lista de símbolos y abreviaturas

- Ad:** Adenovirus.
Ad2: Adenovirus tipo 2.
Ad3: Adenovirus tipo 3.
Ad5: Adenovirus tipo 5.
AEC: Aminoetilcarbazol
AS: Ácido siálico.
ATCC: American type culture collection.
BPL: Buenas prácticas de laboratorio.
BSA: Albumina de suero bovino (Bovine Serum Albumine).
CAR: Receptor de adenovirus y virus coxsackie. Es una proteína transmembranal que forma parte de la superfamilia de la inmunoglobulina.
CDK: Quinasa dependiente de ciclina.
CLPS: Partículas similares al core.
Crio-EM: Crio microscopía electrónica.
DIA: Diarrea infecciosa aguda.
DLP: Partícula viral de doble capa.
DMEM: Medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium.
DNA: Ácido desoxirribonucleico.
ds: Double strand.
dsRNA: RNA de doble cadena.
ECwt: Cepa de rotavirus murino.
EGF: factor de crecimiento epidermal.
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal (epidermal growth factor receptor).
eIF2 α : subunidad 2 α del factor eucariota de iniciación de la traducción.
GBM: Glioblastoma multiforme.
GFP: Proteína verde fluorescente.
h.p.i: Horas postinfección.
H-1 PV: Parvivirus de hámster tipo 1.
HCC: Carcinoma hepatocelular.
HRP: Peroxidasa de rábano picante.
HRV2: Rinovirus humano tipo 2.
HSPs: Proteínas de choque térmico.
HSV: Virus del herpes simple.
ICAM1: Molécula de adhesión intercelular 1.
ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
IFN: Interferon.
IFN- α : Interferon alfa.
IFN- β : Interferon beta.
IFN- γ : Interferon gamma.
IR: Radiación ionizante.
iRNA: RNA interferente.
L929: Línea celular de fibroblastos de ratón.
MA104: Línea celular embrionaria de riñón de mono verde.
MFI: Intensidad media de fluorescencia.
MEM: Medio de cultivo celular Modified Eagle's médium.
MFI: Intensidad media de fluorescencia (

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
MMP: Metaloproteasas de matriz extracelular.
MOI: Multiplicidad de infección.
mRNA: RNA mensajero.
MV: Virus del sarampión (measles virus).
MV-Edm: Cepa de vacuna Edmoston del virus del sarampión.
NS1: Proteína viral no estructural 1.
NSP: Proteína no estructural.
NTPasa: Nucleótido trifosfatasa.
OMS: Organización mundial de la salud.
OVs: oncolytic virus.
PBS: Buffer fosfato salino.
PCR: Reacción en cadena a la Polimerasa.
PDI: Proteína disulfuro isomerasa.
PFU: Unidades formadoras de placa.
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.
POC: Prueba de concepto farmacológico.
PV: Poliovirus.
PV1: Poliovirus tipo 1.
qPCR: Reacción en cadena a la polimerasa cuantitativa.
RAS: Rats sarcoma protein.
RE: Retículo endoplásmico.
Reovirus: Acrónimo de la expresión *Respiratory Enteric Orphan Virus*.
RNA: Ácido ribonucleico.
RRV: Rotavirus de mono Rhesus.
FBS: Suero fetal bobino.
SNC: Sistema nervioso central.
Sp2/0 Ag 14: Línea celular de mieloma murino.
ss: Single stand.
ssRNA: RNA de cadena sencilla.
TCR: Receptor de células T.
TLP: Partícula viral de triple capa.
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.
TRUY: Aislado rotaviral producto de mezclar las cepas TRF, RRV, UK y YM
UFF: Unidades formadoras de foco.
UFP: Unidades formadoras de placa.
UNAM: Universidad Autónoma de México.
VP: Viral Protein
VSV: Virus de la estomatitis vesicular.
Wt1-5: Aislado rotaviral producto de mezclar las cepas TRF, RRV, UK y YM.
 α V β 3: Integrina alfa V beta 3

Introducción

El cáncer es un importante problema de salud pública que representa un desafío importante para los sistemas de atención en salud en todo el mundo. Actualmente es la segunda causa de muerte en la estadística global y es superado tan solo por las enfermedades cardiovasculares (1). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una transformación maligna y una proliferación de células progenitoras linfoides en la médula ósea, la sangre y los sitios extramedulares (2). El 80% de leucemias ocurre en niños, siendo la LLA la neoplasia más común en pacientes pediátricos, mientras que en la edad adulta la LLA es la segunda leucemia aguda más común y representa una enfermedad devastadora (3). Las tasas generales de curación para la LLA infantil han mejorado a lo largo de los años y las tasas de supervivencia actuales varían entre el 75% y el 85% en los pacientes tratados en países de altos ingresos. Por el contrario, en los países de bajos ingresos, las posibilidades de curación son menores (4, 5). La quimioterapia es el principal tratamiento convencional de las leucemias y se divide en las fases de inducción, consolidación y mantenimiento a largo plazo (6), incluye medicamentos que bloquean la división celular como los corticosteroides o vincristina, agentes antimetabolitos como methotrexate o citarabina, agentes alquilantes del DNA como la ciclofosfamida y antraciclinas como la daunorrubicina o doxorubicina (2, 6). En general, estos medicamentos tienen una alta toxicidad y efectos secundarios importantes (7, 8). El tratamiento con estos agentes logra el control de la enfermedad en un alto porcentaje de pacientes; sin embargo, las recaídas siguen siendo un desafío importante en el manejo de las neoplasias hematológicas.

Con el propósito de mejorar el tratamiento de las neoplasias, las terapias para el cáncer evolucionan constantemente y los investigadores se mantienen en busca de nuevas estrategias complementarias a la quimioterapia, radioterapia o cirugía. Estos avances han permitido la implementación de terapias como los microRNA (miRNA) (9, 10), los pequeños RNA interferentes (siRNA) (11, 12), inmunoterapia (13), quimioterapia basada en la señalización celular (14) y la viroterapia (15, 16). Para que un virus sea candidato a convertirse en una terapia efectiva contra el cáncer debe cumplir varios criterios tales como una replicación selectiva dentro de las células cancerosas, tener la capacidad de diseminarse dentro de los tejidos tumorales, no infectar células y tejidos normales, no ser patógeno para los humanos, e idealmente debe poder ser manipulado genéticamente para mejorar su seguridad y eficacia (17). Los principales virus oncolíticos que se emplean actualmente incluyen el adenovirus, virus Herpes simplex (HSV), sarampión, vaccinia, reovirus y virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (18). Varias características de las células neoplásicas las hacen más susceptibles a los virus oncolíticos cuyo tropismo para estas células depende de la maquinaria de transcripción y vías de señalización tumorales (19, 20). Una de las mayores dificultades para la aplicación exitosa de la viroterapia oncolítica ha sido la capacidad para administrar el virus específica y eficientemente al tumor (20). Una de las estrategias que se abordan para dar solución a esta limitante es la selección de las células neoplásicas mediante la expresión de receptores de membrana

específicos, debido a que el ingreso del virus oncolítico al interior de la célula tumoral depende de la unión de proteínas virales a receptores de la superficie celular. Generalmente estos receptores están sobre expresados en algunas células tumorales pero ausentes en las células normales y son específicos de cada virus oncolítico (21).

Diferentes estudios han mostrado que el rotavirus posee tropismo por células que expresan proteínas de la familia de las integrinas como la $\alpha V\beta 3$ (22, 23), $\alpha 2\beta 1$ (24, 25), $\alpha IV\beta 1$ (26, 27), Hsc70 (28-30) y PDI (31-33) en la superficie de la membrana citoplasmática. Adicionalmente, varios ensayos han documentado una expresión elevada de proteínas de choque térmico (HSPs), integrinas como la $\alpha V\beta 3$ y PDI en la membrana citoplasmática de células neoplásicas. Estas proteínas desempeñan un papel importante en la carcinogénesis a través de la regulación de la angiogénesis, la proliferación celular, la migración, control de vías apoptóticas, resistencia a algunos medicamentos contra el cáncer y la metástasis en tumores de pulmón, cerebro, próstata, mama, así como en sarcomas y algunos linfomas. Además, estas proteínas tienen un potencial uso clínico como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer, así como también como objetivos terapéuticos (34-36). En células normales las proteínas HSPs, $\alpha V\beta 3$ y PDI se expresan a niveles muy bajos o no se expresan. Recientemente hemos mostrado que varios aislamientos de rotavirus adaptados son capaces de replicarse con éxito e inducir muerte celular en algunas líneas de células tumorales que tiene una expresión de estas proteínas en la membrana citoplasmática (37).

En el presente estudio, determinamos el potencial efecto oncolítico del rotavirus Wt1-5 adaptado en la línea celular Reh de leucemia linfoblástica aguda humana. Nuestros resultados muestran que el rotavirus Wt1-5 pudo infectar, replicarse y lisar las células Reh. La inoculación con el rotavirus Wt1-5 adaptado genera efectos citotóxicos sobre la línea tumoral, observando cambios en la integridad de la membrana, en el potencial de membrana mitocondrial, fragmentación de DNA y la activación de señales relacionadas con muerte celular dependiendo de la concentración del inóculo viral. Adicionalmente, se encontró una participación de las proteínas de membrana citoplasmática Hsp90, Hsp70, Hsc70, $\alpha V\beta 3$ y PDI durante el proceso de entrada del rotavirus a la célula.

1. Capítulo 1. Estado del arte

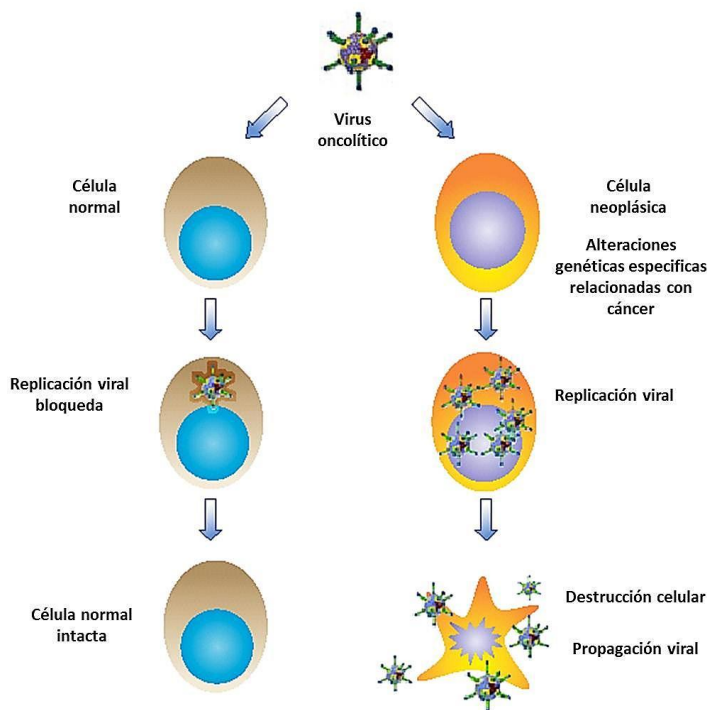
La siguiente conceptualización engloba los elementos más notables para el desarrollo de nuestro proyecto. No se busca agotar el tema, puesto que es excesivamente extenso, y resultaría inoficioso recoger la totalidad de conceptos expresados en relación a los mismos. Considerando lo anterior, la revisión se orienta a describir los aspectos más relevantes en relación a los virus oncolíticos, el rotavirus, las proteínas de choque térmico, PDI, integrina $\beta 3$ y la leucemia linfocítica aguda en la población pediátrica.

1.1 Virus oncolíticos

A los virus se les conoce como agentes acelulares microscópicos y patológicos que no son retenidos por los filtros habituales para bacterias ya que poseen un tamaño de entre 10-300 nm, carecen de actividad metabólica propia y no pueden auto-replicarse por lo cual requieren una célula hospedadora a la cual infectan e invaden con su DNA o RNA para luego sintetizar nuevas proteínas virales y así incrementar la progenie viral (38). Durante el proceso infeccioso de los virus se generan una diversidad de eventos que conducen a la disminución de la viabilidad celular. Dentro de estos se encuentran la apoptosis, la necrosis y la lisis celular; a todos estos fenómenos se les conocen como efectos citotóxicos y están asociados a la patogenicidad generada por los virus. Con base en estas características, surge la idea de emplear los virus con fines terapéuticos en células neoplásicas, denominados virus oncolíticos (OV) o virus que selectivamente infectan y se replican en células neoplásicas pero que no infectan a las células del tejido normal (39). Aunque la idea de emplear virus como terapia contra el cáncer no es nueva, data de 1912, solo hasta los años 90s se retomaron esfuerzos para re-investigar la hipótesis anteriormente formulada respecto a si los virus pueden ser utilizados para destruir células tumorales gracias a la versatilidad del genoma viral y a la capacidad de realizar modificaciones a los mismos, para así lograr un efecto citotóxico específico en las células de cáncer (40, 41). Algunos de estos virus son cepas naturalmente atenuadas, tales como cepas de reovirus o virus vesiculomatosos, que infectan efectivamente o se replican selectivamente en células de cáncer. Otros virus han sido genéticamente modificados para dirigir sus efectos oncolíticos o disminuir su carácter patológico natural como el caso del virus herpes simple (HSV) tipo 1 o el adenovirus (Ad) (39).

Independientemente de las modificaciones genéticas a las que se sometan los virus y las estrategias terapéuticas que se diseñen, el objetivo primordial siempre será lograr la lisis o muerte celular exclusivamente en tejidos tumorales, producto de la replicación de los virus oncolíticos **Ilustración 1**. La selectividad de los virus oncolíticos hacia las células de cáncer parece ocurrir durante la infección o durante la replicación principalmente. Entonces, virus con tropismo selectivo hacia el tejido tumoral pueden ser creados modificando las proteínas virales que reconocen receptores celulares específicos, permitiendo que el virus ingrese selectivamente en las células tumorales. La replicación selectiva puede ser creada modificando los genes virales que se requieren para una eficiente replicación en la célula blanco (39).

Ilustración 1. Mecanismo de oncolisis selectiva.



Tomada de: Cervantes-García, D., Ortiz-López, R., Mayek-Pérez, N., Rojas-Martínez, A. (2008). Oncolytic virotherapy. *Annals of Hepatology*, 7 (1), 34-35. (42)

La seguridad y eficiencia de los virus oncolíticos fue ampliamente debatida y estudiada en el periodo de 1904-1980, durante este espacio, pacientes con cáncer fueron inoculados con muchas cepas de virus vivos atenuados, incluyendo el virus de la rabia, virus de la parotiditis, adenovirus, virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la influenza entre

otros (43, 44). En estos ensayos los efectos terapéuticos de la estrategia oncolítica fueron bien establecidos y se informó la regresión tumoral en pacientes con cáncer cervical después de la vacunación con el virus de la rabia y remisión en pacientes con linfoma de Burkitt y Hodgkin después de sufrir de sarampión (45, 46). En los años 20s-40s, dentro de los ensayos históricamente descritos respecto al uso de los virus para tratamiento del cáncer y su evaluación en modelos animales, se reportó la lisis tumoral por el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus de la influenza (47, 48). Una década más tarde, se emplearon diversos serotipos de adenovirus silvestres (Wild type Ad) para el tratamiento de cáncer cervical. En estos ensayos, aunque hubo regresión de varios tumores sin causar toxicidad en más de la mitad de los individuos, se observó progresión de la enfermedad en todos los pacientes (49). Justamente la ausencia de actividad antitumoral duradera por parte de los virus se reflejó en otros experimentos en humanos durante ese tiempo e hizo que los investigadores abandonaran este modo de terapia (50). Para aquel entonces, la virología se encontraba en su primera infancia sin contar con la tecnología ni el desarrollo del conocimiento suficiente para proseguir con los análisis. Hoy en día, gracias a los avances en la biología tumoral, la biología molecular y la virología molecular, el estudio de los virus oncolíticos ha sido retomado. En la **Tabla 1.** se enumeran los virus que son actualmente evaluados como virus oncolíticos.

Tabla 1. Virus actualmente implementados en terapia contra el cáncer.

Virus DNA			
Genoma	Familia	Genero	Especie/Cepa/Vector
ds	<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus	Ad serotipo 5 y algunos derivados de hallazgos experimentales y ensayos clínicos.
		Aviadenovirus	Vector de replicación deficiente CELO.
		Atadenovirus	El adenovirus Ovino tipo 7 vector OAdV623 y OAdV220.
	<i>Asfarviridae</i>	n.f.	
	<i>Herpesviridae</i>	Simplexvirus	Varios vectores competentes en la replicación silvestres y modificados en el laboratorio, cepa experimental humana SV-1. Vector competente en la replicación HSV-2
		Rhadinovirus	Vector competente en la replicación basado en el HSV bobino tipo 4.
		Varicellovirus	Vector competente en la replicación psudorabia.
	<i>Iridoviridae</i>	n.f.	
	<i>Papillomaviridae</i>	n.f.	
	ds/ss	<i>Polyomaviridae</i>	Polyomavirus
<i>Poxviridae</i>		Orthopoxvirus	Vector deficiente en la replicación basado en Vaccinia cepa WR y Wyeth.
		Leporipoxvirus	Vector competente en la replicación basado en Mixomavirus.
		Yatapoxvirus	Vector competente en la replicación basado en el virus de la enfermedad de Yaba
<i>HepDNAaviridae</i>		n.f.	
<i>Circoviridae</i>		n.f.	
<i>Parvoviridae</i>		Parvovirus	Parvovirus de roedores Vivo autónomo H-1.
	Dependovirus	Vector defectivo en la replicación basado en varios serotipos de adenovirus asociados.	

ss	Rabdoviridae	Respirovirus	Vector deficiente en la replicación basado en Virus Sendai.
		Rubulavirus	Virus vivo de la parotiditis fase experimental y ensayos clínicos para tratar cáncer de ovario. Vector no oncolítico deficiente en la replicación basado en Virus simiano tipo 5.
		Vesiculovirus	Virus vivo atenuado de la estomatitis vesicular y derivados recombinantes.
	Arteviridae	n.f.	
	Coronaviridae	Coronavirus	Actividad Oncolítica In vitro de replicación retardada basado en coronavirus felino y virus de la hepatitis murino.
	Flaviviridae	*	
	Nodaviridae	n.f.	
	Picornaviridae	Enterovirus	Ecovirus vivo tipo 1. Coxsackie virus A21 vivo. Poliovirus Tipo 1. Enterovirus bobino.
		No asignado	Virus del Valle de Seneca vivo SVV-001 en ensayo clínico.
	Togaviridae	Alphavirus	Virus Sindibis y virus Sindibis vivo atenuando
Retroviridae	Gamaretrovirus	Virus competente y deficiente en la replicación MoMLV, en ensayos clínicos.	
	Lentivirus	Vector deficiente en la replicación basado en HIV-1	
	Spumavirus	Vector competente en la replicación basado en el virus Foamy.	
Virus RNA			
Genoma	Familia	Genero	Especie/Cepa/Vector
ds	Birnaviridae	n.f.	
	Reoviridae	Orhtoreovirus	Reovirus vivo tipo 3 cepa T3D en ensayos clínicos.
ss	Arenaviridae	*	
	Bornaviridae	n.f.	
	Bunyaviridae	*	
	Fitloviridae	n.f.	
	Orthomyxoviridae	Virus de la influenza A	Virus de la Influenza tipo A competente en la replicación con delección de NS1.
	Paramyxoviridae	Avulavirus	Virus de la enfermedad de Newcastle atenuado 73T, PV701 y MTH-68/H.
		Morbilivirus	Vector competente en la replicación vasado en varias cepas de virus del sarampión.
	Astroviridae	n.f.	
Caliciviridae	n.f.		

Tomado de Markus J.V. Va'ha'-Koskela, Jari E. Heikkila, Ari E. Hinkkanen. (2007) Mini-review Oncolytic viruses in cancer therapy. Cancer Letters 254. 178-216. (51)

Convenciones:

n.f. = no found. Los datos usados para los miembros de esta familia de virus que son empleados en el tratamiento del cáncer no se pudieron encontrar en PubMed utilizando combinaciones de la familia del virus, especie, raza o nombre del vector y las palabras clave tales como cáncer, viroterapia oncolítica, tumoral e intratumoral.

* = Una multitud de diferentes virus se han utilizado en estudios para tratar tumores en modelos animales, pero no se han desarrollado como virus oncolíticos. Se han informado de hasta 16 virus diferentes de la familia Arenaviridae, Bunyaviridae, flaviviridae, Reoviridae y familias Togaviridae con eficacia como virus empleados en el tratamiento de sarcoma y en tumores de Erlich en ratones. Hasta donde sabemos, ninguno de estos virus, con excepción de los virus de Sindbis, se han desarrollado para viroterapia.

ad = Adenovirus

ds = Double strand (hebra doble)

ss = Single strand (hebra única)

1.1.1 Virus oncolíticos de DNA seleccionados en el laboratorio y utilizados en la clínica

La habilidad que tienen los virus para lisar células humanas fue usada para tratar el cáncer en el siglo pasado, pero se abandonó debido a la toxicidad (52). Con la tecnología recombinante, se mejoraron genéticamente y su seguridad incrementó, porque la selectividad hacia células tumorales aumentó, como se demostró en 1991 con el herpes simple tipo 1 (HSV-1) en un modelo experimental de glioma (40). Cinco años después, se creó el adenovirus Onyx-015, primer virus oncolítico creado para experimentar en tratamientos clínicos de pacientes con cáncer (53, 54).

- **Virus herpes:** El herpes virus-1 (HSV-1) es un virus envuelto de doble hebra lineal de DNA, con un genoma de 152 kb que codifica más de 80 genes. Aproximadamente la mitad de los genes son necesarios para la replicación del virus. El genoma de este virus está compuesto por un segmento largo (UL) y segmento corto (Us) que son flanqueados por repeticiones invertidas (55). La infección puede ser lítica o latente. Durante la infección lítica, los genes del virus son expresados temporalmente en una cascada regulada consistente en tres fases, designada alfa, beta y gama. Tienen gran habilidad para replicarse en tejido neuronal, por esto, el HSV oncolítico fue primero probado en pacientes con glioma maligno. Entre 1997 y 1999, dos grupos realizaron la fase I para tratamiento. Analizaron la dosis, la seguridad del tratamiento y la replicación selectiva del virus HSV-1716 Y G207 en el tratamiento de tumores malignos en el cerebro (55).
- **Adenovirus:** El primer virus estudiado en tratamiento clínico es el adenovirus ONYX-15 y cuenta con 18 publicaciones en fase I y fase II en tratamientos clínicos, que comenzaron en 1996. La estrategia ha puesto empeño en demostrar la seguridad de la administración intratumoral, seguido por instalación intracavitaria (intraperitoneal), infusión intra-arterial (arteria hepática), y finalmente la administración intravenosa sistémica. Se han desarrollado estudios donde participaron solamente pacientes con cáncer incurable, una vez se demostró su seguridad, se estudió en pacientes con condiciones pre malignas. Como consecuencia de los resultados clínicos, ONYX-015 actualmente se somete a ensayos clínicos en combinación con quimioterapia (53).

1.1.2 Virus oncolíticos de RNA seleccionados en el laboratorio y utilizados en la clínica

- **Reovirus:** Reovirus pertenece a la familia Reoviridae, la cual se divide en 6 géneros Orthoreovirus, Colitivirus, Orbivirus, Fijivirus, Cypovirus y Rotavirus. Todos estos virus tienen una variedad de tropismos (animales, plantas, e insectos). (56) El reovirus es relativamente no patógeno en los seres humanos, a diferencia del rotavirus. En 1959, Sabin acuñó el nombre de reovirus como un acrónimo que significa no patógeno (57).

El potencial del Reovirus y su conexión con el cáncer comenzó en 1977, cuando Hashiro et al., documentaron la susceptibilidad de células transformadas a la replicación de reovirus y encontró que las células sin transformar “normales” eran resistentes al virus (58). Más tarde se reportó que al infectar con reovirus a células WI-38, que normalmente no son susceptibles a reovirus, junto con “antígeno T mayor de SV-40” el reovirus sí se replicaba (59). Aunque estos estudios insinuaban el potencial oncolítico del reovirus, el mecanismo de la sensibilidad celular al reovirus permaneció ambiguo por mucho tiempo. Recientemente, el reovirus tipo-3 ha sido investigado como un agente oncolítico contra una variedad de cánceres humanos (60). El potencial oncolítico de reovirus también se está investigando en tratamientos clínicos (<http://www.oncolyticsbiotech.com>). Estos estudios han revelado que todos los reovirus infectan células cancerosas, sin afectar las células normales (61, 62). Se ha propuesto que los reovirus requieren una vía de Ras activa, que es una vía de señalización para mediar oncólisis (63-65). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la vía Ras activa por sí sola no tiene control sobre la susceptibilidad de las células para infección de reovirus (66-68). El tratamiento de la fase I con reovirus (Reolysin®) en tumores sólidos cutáneos con inyecciones en la parte lesionada ha sido conducido por un grupo canadiense (69) y el virus no causa ninguna toxicidad en la dosificación (55). Los ensayos clínicos que se han hecho se presentan en la **Tabla 2 y 3**.

Tabla 2. Virus usados actualmente en ensayos clínicos.

Nombre	Cepa	Alteración genética	Enfermedad	Fase
ONYX-015	Quimera Adv 2/5	Deleción en el gen E1B	Cáncer de cabeza y cuello. Cáncer de ovario Tumor primario y secundario de Hígado	II-III I I-II

			Cáncer de Páncreas	I
CV706	Adv 5	Regulación del gen E1A con el promotor PSA, Delección del gen E3	Cáncer de Próstata (confinado al órgano)	I-II
CV787	Adv 5	Regulación del gen E1A con el promotor de Probasin. Y regulación del gen E1B con el promotor PSA.	Cáncer de Próstata (confinado al órgano y metastásico)	I-II
G207	HSV-1	Inserción de Lac Z dentro de gen ICP6, delección de los genes $\sigma\gamma$ 134.5	Glioma Maligno	I-II
NV1020	HSV-1/HSV-2	Delección de tk 700 bp + delección de 15 kb en la región que contiene una copia exógena del gen tk controlado por el promotor de HSV-1 α 4.	Carcinoma Colorrectal Metástasis Hepáticas	I
Vaccina-GM-CSF	Vaccinia	Inserción de GM-CSF y del gen Lac Z dentro de locus vital TK.	Melanoma	I-II
PV701	NDV	Naturalmente atenuado	Tumores sólidos avanzados	I

Modificada de Fountzilias, C., Patel, S., & Mahalingam, D. (2017). Review: Oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget*, 8(60). doi:10.18632/oncotarget.18309 (42)

Tabla 3. Ejemplos de ensayos clínicos para viroterapia oncolítica.

Vector oncolítico	Tumor objetivo	Dosis	Efectos adversos	Efectos terapéuticos
Reolysin	Diversos	1×10^7 a 1×10^9 pfu intratumoral.	Síntomas similares a resfriado, dolor de cabeza, dolor y fatiga	Remisión Completa en 11 % de pacientes
H101	Diversos	5×10^{11} vp durante días. Intratumoral.	Fiebre, dolor en el lugar de aplicación, algunos eventos de disfunción Hepática y síntomas similares a resfriado	100% de pacientes con respuesta completa y 24% con respuesta parcial
CG7870	Metastásicos Cáncer de próstata refractario	1×10^{10} a 1×10^{12} vp Intravenosos.	Síntomas similares a resfriado	Disminución de los niveles de PSA en suero de 24% al 49% en 22% de los pacientes

Adaptado de Cervantes-García, D., Ortiz-López, R., Mayek-Pérez, N., Rojas-Martínez, A. (2008). Oncolytic virotherapy. *Annals of Hepatology*, 7 (1), 34-35 (42).

1.1.3 Consideraciones a tener en cuenta según “the international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ich)” para el diseño de terapias contra el cáncer basadas en virus oncolíticos (emea/chmp/ich/607698/2008)

La ICH es una organización internacional que se ha encargado de sugerir unas consideraciones y pasos a tener en cuenta cuando se inicia un trabajo con un virus buscando utilizarlo como agente oncolítico (70). Estos importantes aspectos se describen a continuación.

1.1.3.1 Selectividad

Antes de ser usados en estudios clínicos con pacientes, se debe demostrar la selectividad replicativa de los virus oncolíticos en células tumorales mediante la ejecución de ensayos *in vitro* con líneas celulares permisivas y no permisivas que incluyan la caracterización de la citotoxicidad y/o lisis celular. Es posible que existan dificultades o limitaciones relacionadas con este proceso, por lo cual inicialmente se pueden usar cultivos elaborados a partir de explantes de tejidos humanos normales y de tumores.

Por otra parte, aunque la selectividad también puede ser demostrada en estudios *in vivo* no clínicos, siempre hay que tener en cuenta que este aspecto no representa una medida directa del potencial antineoplásico de los virus oncolíticos. Por lo tanto, para posibilitar su uso como agente anticancerígeno, se deben realizar ensayos que arrojen cualquier evidencia de actividad biológica relacionada con la propagación viral en la masa tumoral.

1.1.3.2 Variantes moleculares

La caracterización de cada uno de los virus oncolíticos incluye la verificación de la existencia de sus correspondientes variantes moleculares, de las cuales se deben tener en cuenta las que resultan de la replicación selectiva o del perfil oncolítico. La naturaleza y la cantidad de variantes determinan la estrategia experimental a seguir para su selección, evaluando la estabilidad genética de los vectores antineoplásicos.

1.1.3.3 Selección de modelos animales y limitaciones asociadas a ellos

Para la selección de un modelo animal no sólo se debe tener en cuenta el propósito del estudio, sino también el tropismo viral, la infectividad, la capacidad de replicación, el potencial citopático y el efecto antitumoral del virus oncolítico. Son igualmente útiles para pruebas no clínicas las especies que no desarrollan neoplasias y los animales singénicos, o los portadores de tumores xenotransplantados, a pesar de que los factores limitantes incluyan susceptibilidad a la infección y al ciclo viral, además de la inhabilidad para controlar la respuesta inmune.

1.1.3.4 Farmacología-prueba de concepto (POC)

La POC consiste en evaluar los aspectos relacionados con la bioactividad, el potencial mecanismo de acción y el perfil farmacológico de los virus oncolíticos, es decir, que su capacidad para inducir los efectos biológicos deseados *in vivo* sea verificable. Para tal efecto, los estudios correspondientes deben contribuir a establecer la justificación científica para la administración de este tipo de vectores en una población específica, abordando su factibilidad biológica para ser usado en el cáncer a tratar, lo cual incluye su selectividad replicativa y su consecuente actividad antitumoral. Adicionalmente, la importancia de estos estudios radica en que ayudan a: (1) Definir un intervalo de dosis farmacológicamente activas, estableciendo una que sea óptima y otra mínimamente efectiva, (2) Definir una ruta potencialmente adecuada para el suministro de un determinado virus oncolítico, y (3) Fijar un esquema de dosificación para las fases iniciales de los respectivos ensayos clínicos.

1.1.3.5 Biodistribución

Los estudios de biodistribución en animales implican analizar la propagación de los virus oncolíticos en los órganos blanco y en los que no lo son, para lo cual se pueden aplicar ensayos detectando proteínas virales (Inmunocitoquímica), o sondas que identifiquen ácidos nucleicos virales. También se recomienda emplear un método sensible como el de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

1.1.3.6 Consideraciones para la excreción viral

La excreción viral se define como la propagación de virus oncolíticos a través de secreciones y/o excreciones de los pacientes. De aquí surge como un motivo de preocupación el hecho de que un manejo terapéutico inadecuado de estos vectores pueda

desencadenar transmisión de humano a humano que puede ser, por decirlo de alguna forma, biológicamente inoportuna, debido a la generación de inmunidad contra el virus oncolítico.

Por esta razón, la evaluación de la excreción viral en animales es clave para orientar el plan de seguimiento clínico de la actividad terapéutica de un virus oncolítico. La información que esté disponible al respecto es una gran ayuda en este sentido, y en especial, para la vigilancia de una potencial manifestación notable de efectos secundarios a largo plazo, tanto en estudios clínicos como en no clínicos.

1.1.3.7 Toxicología y estudios de seguridad terapéutica

El perfil de expresión de transgenes (si están presentes), y el de biodistribución y persistencia de los virus oncolíticos, orientan con frecuencia la duración de los correspondientes estudios toxicológicos y la fijación de los intervalos de tiempo para el sacrificio de los animales. Ante esta situación, que puede ser bastante variable, la evaluación toxicológica de este tipo de vectores debe ser lo suficientemente exhaustiva para identificar, caracterizar y cuantificar el potencial de toxicidad local y sistémica posterior al suministro viral.

Adicionalmente, las especies animales, la ruta y el procedimiento de suministro viral, el intervalo de dosis potencialmente terapéuticas y el régimen de dosificación establecidos a partir de la correspondiente POC deben guiar el diseño de los respectivos estudios toxicológicos. En vista de que de lo anterior puede depender la toxicidad de los virus oncolíticos, se debe limitar en la mayor medida posible el escenario clínico pretendido en el largo plazo, de tal manera que los resultados medidos incluyan los efectos tóxicos agudos y crónicos, al igual que su reversibilidad, toxicidad retrasada, mutagénesis de inserción y cualquier relación dosis-respuesta.

Sumado a lo anterior, se debe considerar la posible transmisión de la línea germinal de vectores de terapia genética para controlar el riesgo de integración inadvertida. Entonces, las pruebas toxicológicas requerirán reflejar las características biológicas de los virus oncolíticos, incluyendo su potencial de replicación, su infectividad en células y tejidos

normales, y una ocasionalmente indeseable respuesta inmune antiviral y/o contra la activación de transgenes.

1.1.3.8 Estudios de buenas prácticas de laboratorio (BPL)

Los criterios de valoración de seguridad son a menudo obtenidos a partir de ensayos realizados con animales portadores de tumores, de los cuales pueden resultar situaciones únicas del cuidado animal. Para algunos estudios que emplean métodos especializados de prueba puede resultar difícil cumplir plenamente las BPL, haciéndose más evidente esta situación si las leyes regionales exigen su cumplimiento.

1.1.3.9 Estudios clínicos

La necesidad de realizar estudios que indiquen la dosis a usar en un paciente es importante, lo cual determina un nivel de dosis inicial seguro. Aunque es posible que los datos de la dosificación animal no proporcionen adecuada información de seguridad, una estrategia usada frecuentemente para establecer la ruta de suministro apropiada ha sido seguir un enfoque por etapas, comenzando por la inyección intratumoral, pasando luego por la administración regional o local, para después trascender hacia la inoculación sistémica.

Una vez seleccionada una ruta de suministro segura, esta debe ser justificada, al tiempo que se debe tener en cuenta el potencial de replicación del virus oncolítico en tejidos que no son su objetivo. De lo contrario, debe existir un plan de seguimiento clínico que considere los parámetros regionales disponibles o que se puedan encontrar en rigor.

1.1.3.10 Farmacocinética, farmacodinamia y actividad biológica

Tanto la PCR como los ensayos de infectividad han sido usados para monitorear la proliferación de los virus oncolíticos, lo cual se debe realizar con suficiente frecuencia y duración para detectar un eventual pico secundario de cantidad de vectores en la sangre después de la administración como un potencial indicio de replicación viral en cualquier tejido permisivo. Otros enfoques pueden ser usados para vigilar el ciclo viral de este tipo de partículas, dentro de los que se incluyen los niveles de algún marcador viral o la actividad de un transgen en especial. Para tal efecto, también se puede considerar el uso de un transgen que no sea terapéutico como marcador siempre y cuando sea

adecuadamente justificado. Independientemente de la dificultad que exista al medir la presencia y/o distribución de los virus oncolíticos en una masa tumoral, resulta ser de gran utilidad la información que se obtiene de la patología neoplásica en la medida en que sea posible practicar previamente una resección o una biopsia.

1.1.3. 11 Bioseguridad

Es importante que al administrar tratamientos basados en virus oncolíticos se sigan las precauciones habituales para el manejo de material infeccioso y las pautas de bioseguridad o sus equivalentes. También se deben seguir las regulaciones emitidas por las entidades competentes, los países, los estados, y las localidades. Generalmente, como parte del protocolo clínico, todas las autoridades reguladoras establecen la necesidad de usar algunas formas de barrera protectora durante la duración de los correspondientes ensayos clínicos como una medida estándar para evitar la transmisión persona a persona.

Para la preparación de dichos ensayos y de la evaluación de métodos de detección, los estudios no clínicos de excreción viral pueden ser útiles. Obviamente, es aconsejable integrar el monitoreo de propagación de virus oncolíticos al plan de desarrollo clínico, dado que las consecuencias de la transmisión a otras personas pueden no ser bien entendidas, lo que naturalmente obliga a tomar precauciones para minimizar la exposición del personal de asistencia médica, miembros de la familia y otros contactos de los pacientes.

Igualmente, se debe tener en cuenta el hecho de minimizar la exposición de personas inmunocomprometidas o inmunosuprimidas, así como la de otras poblaciones potencialmente afectables. De manera complementaria, puede ser apropiado instruir al paciente y a los miembros de la familia sobre cómo podrían ayudar a reducir el riesgo de transmisión persona a persona después del suministro ambulatorio y en la vida diaria, lo cual puede incluir la asesoría para el uso de medidas específicas de saneamiento.

1.2 Rotavirus

1.2.1 Características generales de los rotavirus

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, el término rotavirus proviene del latín *rota* por su apariencia de una rueda de carreta; se caracteriza por presentar simetría icosaédrica, con un diámetro promedio de 75nm y no posee envoltura lipídica. El genoma

se encuentra protegido por tres capas proteicas concéntricas en las cuales se encuentran distribuidas las diferentes proteínas estructurales como se observa en la **Ilustración 2**, así: en la capa más externa se encuentran por las proteínas estructurales VP4 y VP7, que permiten la clasificación por serotipos de acuerdo con las especificaciones antigénicas de estas proteínas, la capa media está formada por la proteína VP6 y en la capa interna VP1, VP2 y VP3. Además posee seis proteínas no estructurales (NSP1 - NSP6). Cuenta con 60 espículas extendidas en la superficie de la capa externa. Los capsómeros de la capa interna se proyectan a la periferia dando la apariencia circular “rueda”. El core tiene una apariencia hexagonal con unos 37nm de diámetro. Los rotavirus infectan las células epiteliales del intestino delgado, en donde se replican y producen citolisis (71).

Ilustración 2. Estructura morfológica del rotavirus.

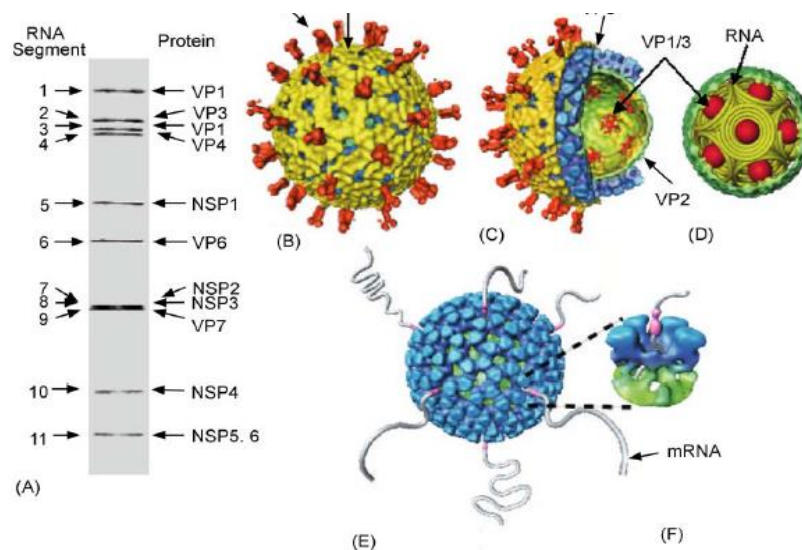


Ilustración 2. Características estructurales de los rotavirus. **(A)** Corrido electroforético de los 11 segmentos de dsRNA que constituyen el genoma rotaviral. **(B)** Modelo construido a partir de crio-Microscopía Electrónica (crio-EM) de una partícula de triple capa proteica (TLP). La proteína VP4 en forma de espiga está coloreada en naranja y la capa proteica de VP7 en amarillo. **(C)** Un corte de la TLP permite observar las capas internas: proteína VP6 en azul y VP2 en verde, además de las enzimas transcripcionales VP1 y VP3 en rojo e incrustadas en VP2 con un plegamiento de 5 ejes. **(D)** Esquema de la organización del genoma rotaviral, los segmentos están representados como espirales cónicas invertidas alrededor de las enzimas transcripcionales. **(E y F)** Modelo construido a partir de crio-EM de una partícula de doble capa proteica (DLP) en proceso de transcripción, en el que simultáneamente se liberan los transcritos de mRNA por los canales localizados en los vértices de los cinco ejes del icosaedro de la DLP. Tomado de Estes MK, Graham DY (1985) Rotavirus antigens. *Adv Exp Med Biol* **185**: 201-214. (72)

1.2.2 Genoma

El rotavirus posee un genoma segmentado de RNA lineal de doble hebra (dsRNA), contiene 11 segmentos que codifican 12 proteínas, ver **Ilustración 3**. El tamaño promedio del total del genoma es de 18.500 pb. Los segmentos genómicos varían de tamaño con un rango que va desde 667 a 3.302 nucleótidos. El dsRNA viral contiene estructuras cap 5' metiladas, pero carecen de poli A, en cambio, el mRNA de los rotavirus tienen en su extremo 3' una secuencia consenso (UGACC) que se conserva en todos los 11 segmentos virales (71).

Ilustración 3. Segmentos genómicos rotavirales.

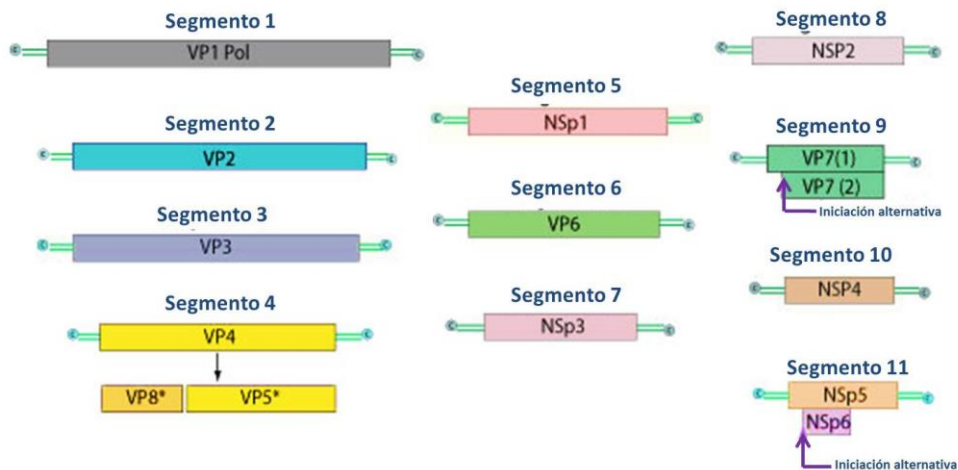


Ilustración 3. Segmentos genómicos rotavirales. El *segmento genómico 1* codifica para la proteína rotaviral **VP1**. El *segmento genómico 2* codifica para la proteína rotaviral **VP2**. El *segmento genómico 3* codifica para la proteína rotaviral **VP3**. El *segmento genómico 4* codifica para la proteína rotaviral **VP4**. El *segmento genómico 5* codifica para la proteína rotaviral **NSP1**. El *segmento genómico 6* codifica para la proteína rotaviral **VP6**. El *segmento genómico 7* codifica para la proteína rotaviral **NSP3**. El *segmento genómico 8* codifica para la proteína rotaviral **NSP2**. El *segmento genómico 9* codifica para la proteína rotaviral **VP7**. El *segmento genómico 10* codifica para la proteína rotaviral **NSP4**. El *segmento genómico 11* codifica para la proteína rotaviral **NSP6**. Imagen modificada de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html jun de2018.

1.2.3 Características de las proteínas virales

1.2.3.1 Proteínas estructurales.

a) Proteínas de la nucleocápside. Las proteínas que conforman la nucleocápside son VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas están implicadas en la replicación viral (57). VP1 es la proteína codificada por el segmento 1 y actúa como RNA polimerasa dependiente de RNA, ya que presenta dominios homólogos a otras RNA polimerasas de otros virus (71, 73). VP2 está codificada en el segmento 2 del genoma y es la única proteína que tiene sitios de

unión a ácidos nucleicos (DNA, RNA de cadena sencilla –ssRNA- y RNA de cadena doble –dsRNA-), aunque preferencialmente se une a dsRNA, pero la unión no es secuencia específica. Esta proteína tiene la capacidad de ensamblarse y formar partículas similares al core (CLPs). VP3 está codificada en el segmento 3 del genoma y presenta 12 moléculas por virión. Se une covalentemente a GTP, lo que ha permitido proponerla como la guanililtransferasa viral (73). En la **Ilustración 4**, se observa la organización de las proteínas de la nucleocápside.

Ilustración 4. Organización de las proteínas estructurales rotavirales.

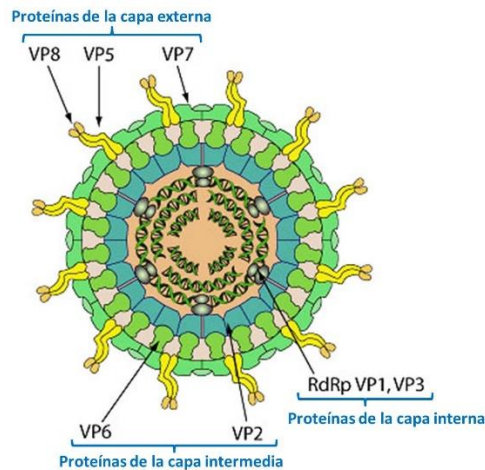


Ilustración 4. Esquema de la organización de las proteínas estructurales rotavirales. Un corte esquemático de la TLP que permite observar la capa interna conformada por las proteínas transcripcionales VP1 y VP3 y por la proteína VP2. La capa intermedia conformada por la proteína VP6 y la capa externa conformada por las proteínas VP5, VP7 y VP8. Imagen modificada de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html jun de2018.

b) Proteínas de la capa intermedia. En la **Ilustración 4**, se puede observar la organización de las proteínas de la capa intermedia. Esta capa del virus está formada por la proteína más abundante del virión, VP6, codificada en el segmento 6 y presenta 780 moléculas por virión. VP6 forma espontáneamente trímeros y es muy estable; esta característica y el hecho de que contiene determinantes antigénicos o epítopes conservados entre diferentes cepas de rotavirus, son la razón de que VP6 sea el blanco antigénico principal en los ensayos de diagnóstico inmunológico para los rotavirus. Los epítopes de VP6 que son conservados entre todas las cepas de rotavirus del grupo A, son llamados epítopes de grupo. En esta proteína también se han identificado otros epítopes, llamados epítopes de subgrupo, los cuales han sido utilizados como marcadores epidemiológicos para clasificar diferentes cepas dentro del grupo A. Si se remueve VP6 de

las DLPs se pierde la actividad de transcriptasa, aunque hasta la fecha no se ha reportado que esta proteína tenga este tipo de actividad (71).

c) Proteínas de la capa externa. La capa más externa del virus está formada por las proteínas VP4 y VP7, que son las proteínas responsables de los primeros contactos con la célula hospedera y por lo tanto tienen funciones que determinan la infectividad del virus, tales como la determinación del rango de huéspedes susceptibles al virus, la unión y la penetración del virus a la célula y es por esto que son las principales inductoras de anticuerpos neutralizantes (71, 73).

VP7 es la segunda proteína más abundante, presentando 780 moléculas por virión y está codificada por el segmento 7, 8 o 9 del genoma, dependiendo de la cepa de rotavirus que se analice. VP7 tiene 326 aminoácidos, es una N-glicoproteína cuya maduración depende de la formación de puentes disulfuro intramoleculares y de la presencia de iones calcio. Esta proteína es altamente inmunogénica e induce anticuerpos neutralizantes, que son serotipo específicos (71). VP4 es otra proteína de la capa externa y es codificada por el segmento 4 del genoma, tiene 776 aminoácidos y por cada virión hay 120 moléculas de esta proteína, tiene un peso molecular aproximado de 87 kDa y constituye la hemaglutinina de algunas cepas virales (73); VP4 tiene funciones esenciales en el ciclo replicativo del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración a la célula como en la hemaglutinación, neutralización, virulencia y aumento de la infectividad del rotavirus por proteasas (74). La infectividad de los rotavirus se incrementa por el tratamiento del virus con tripsina (73). Este tratamiento proteolítico resulta en el rompimiento específico de VP4 en dos polipéptidos de menor peso molecular: VP8 (extremo amino de 28 kDa, residuos de aminoácidos 1 al 131) involucrado en procesos de unión a ácido siálico (AS) y VP5 (extremo carboxilo de 60 kDa, residuos de aminoácidos 247 al 776) implicada en las interacciones con la integrina $\alpha 2\beta 1$ y Hsc7. La ruptura ocurre en las argininas de las posiciones 241 y 247 (71). El corte de VP4 no afecta la unión a la célula y ha sido asociado con la entrada del virus al citoplasma celular por endocitosis vía dinamina (75). La **Ilustración 4**, muestra la organización de las proteínas de la capa externa.

1.2.3.2 Proteínas no estructurales.

Las proteínas no estructurales de rotavirus, NSP1 a NSP6, son codificadas por los segmentos 5, 7, 8, 10 y 11, respectivamente. Como su nombre lo indica, estas proteínas no forman parte de la estructura del virión. Son sintetizadas en el citoplasma de la célula durante la infección y tienen funciones relacionadas con el control de la síntesis de 9 proteínas celulares y virales, con la replicación del genoma, con el empaquetamiento de los genes virales y con la maduración de la partícula viral en el interior de la célula, aunque aún no se define completamente el papel de cada una de ellas en estas funciones. (71) NSP1, de naturaleza básica, interactúa con los 34 nucleótidos del extremo 5' del mRNA viral, y con el citoesqueleto, y se ha propuesto que pudiera bloquear la traducción de una fracción de los mRNA virales, conduciéndolos al viroplasma y secuestrándolos para servir como plantillas para la síntesis de la doble cadena del RNA (76). NSP2, de naturaleza básica, como multímero se une preferentemente al RNA de cadena sencilla, interactúa con VP1 y NSP5, y tiene una actividad de nucleósido trifosfatasa (NTPasa) a través de la cual se autofosforila *in Vitro* e *in Vivo*. Estas características han permitido suponer que NSP2 tiene un papel esencial en la replicación del RNA, y por medio de su actividad de NTPasa, podría obtener la energía necesaria para funcionar como un motor molecular, facilitando el empaquetamiento de los RNAs mensajeros en las partículas subvirales (77).

NSP3, de naturaleza ácida, se une a los mensajeros virales reconociendo específicamente las cuatro últimas bases (...GACC3') de la región conservada del extremo 3' de los RNAs; además de interactuar con el citoesqueleto de la célula, interactúa con el factor celular eIF4GI que es un factor de iniciación de la traducción y de esta manera inhibe la traducción celular (78). Adicionalmente, confiere estabilidad al mRNA viral, y participa junto con NSP1 en el proceso de translocación del mRNA hacia el viroplasma, primer paso necesario para la morfogénesis del virus. NSP4 es una glicoproteína residente del retículo endoplásmico, la cual tiene al menos un dominio transmembranal, el cual permite que el extremo carboxilo terminal de esta proteína esté orientado hacia el citoplasma. Este dominio citoplásmico, de 132 aminoácidos, funciona como receptor de las partículas con doble capa, interactuando directamente con VP6. Además, NSP4 interactúa con la proteína VP4, la cual forma parte de la capa externa del virus. La interacción de NSP4 con VP6 y VP4 media la gemación de las partículas de doble capa hacia el interior del Retículo Endoplásmico. Participa en la morfogénesis del virus y está implicada como la proteína que induce la protección (79). NSP5 es una fosfoproteína, de naturaleza básica, con actividad quinasa autocatalítica putativa, presente en células infectadas, esta proteína tiene varias isoformas de alto peso

molecular: 26, 28 y de 30 a 34 kDa (71).

1.2.4 Clasificación.

Rotavirus hace parte de la familia *Reoviridae* y se divide en 7 grupos serológicos de la A a la G ver **Ilustración 5**, donde los grupos rotavirales A, B y C infectan a humanos y los demás grupos serológicos infectan a animales. Han sido clasificados a la fecha 14 serotipos G (glicosilados) con base a la glicoproteína VP7 y 11 serotipos P (susceptible de separación por acción de las proteasas) con base a la proteína VP4 (78).

La coinfección celular con diferentes cepas de rotavirus que pertenecen al mismo serogrupo por ejemplo: A, B, C, permiten que los segmentos del genoma se mezclen (Reassortment genético), similar al cambio genético observado en los virus de la influenza. A pesar de que este proceso podría, teóricamente, producir numerosas combinaciones G-P, parece haber restricciones significativas para esta recombinación y sólo pocas combinaciones de serotipo predominan, asociadas con genotipos P: P[8] y P[4].

Las cepas con serotipos G1, G3, G4 y G9 se asocian con genotipos P[8] y los serotipos G2, se asocian más frecuentemente con el genotipo P[4]. En zonas templadas, los virus del tipo G1P[8], G3P[8], G2P[4] y G4P[8] constituyen la mayoría de las cepas co-circulantes. Sin embargo, la relativa prevalencia de algunos serotipos varía geográficamente y muchas veces de un año a otro (80).

Ilustración 5. Clasificación del rotavirus.

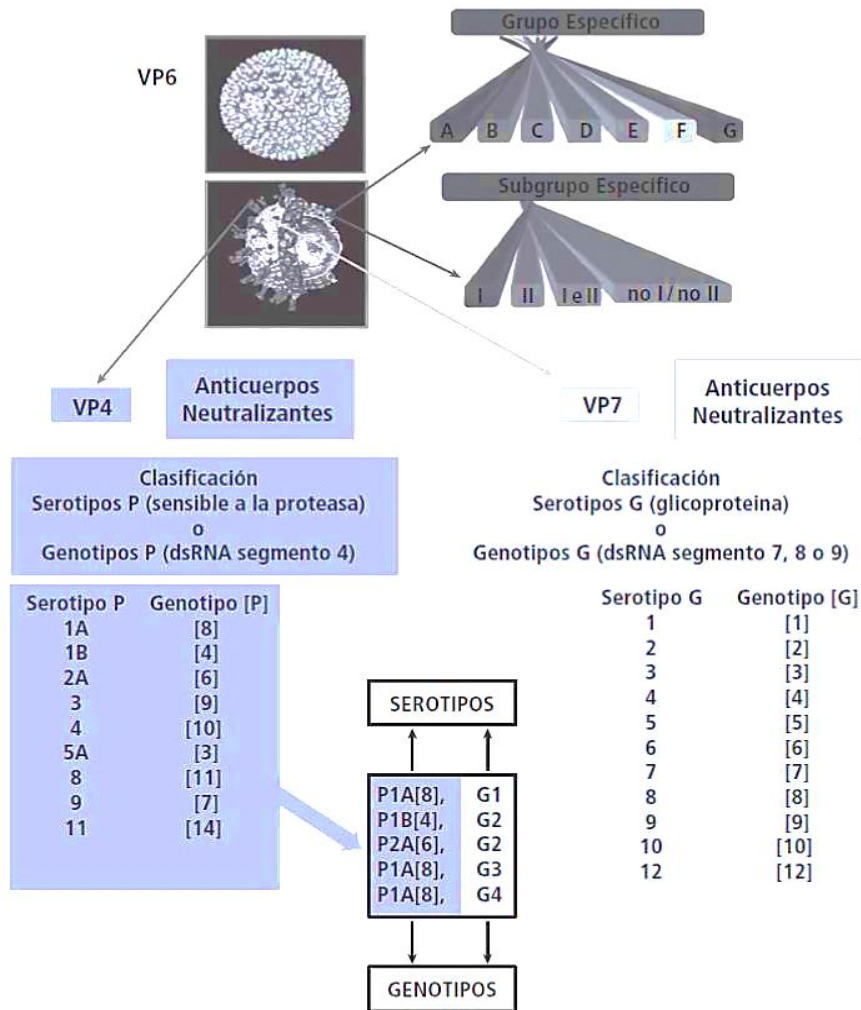


Ilustración 5. Adaptación de la presentación “Diagnóstico de laboratorio y epidemiología molecular de los Rotavirus en las Américas”. Leite JPG, Departamento de Virología, Fiocruz, Ministerio de Salud, Brasil. Presentado durante el Taller Internacional de Vigilancia del Rotavirus. Río de Janeiro, 12 al 16 de diciembre de 2005. Organization, P.A.H. Epidemiologic surveillance of diarrheal diseases due to rotavirus: Field guide. *Organización Panamericana de la Salud Publicación Científica y Técnica No. 623*, 12-43 (2007)(81)

1.2.5 Epidemiología

La diarrea infecciosa aguda (DIA) de origen viral es la causa más común de morbimortalidad en niños y puede ser causada por rotavirus, calicivirus, astrovirus y adenovirus. Los rotavirus producen inflamación del intestino que conlleva a un cuadro de diarrea, vómito, cólico abdominal y en algunos casos fiebre. Según estadísticas, para la edad de 5 años, cada niño habrá tenido por lo menos un episodio de gastroenteritis

causada por rotavirus, 1 de cada 65 será hospitalizado y aproximadamente de cada 293 infectados uno morirá (82).

Los mecanismos exactos de transmisión no son totalmente claros, pero la literatura reporta que el modo primario de infección podría ser directo oro-fecal, seguido de la propagación a través de secreciones del tracto respiratorio. Gracias a que el virus es altamente infectante y muy estable en el medio ambiente, puede sobrevivir horas en las manos e incluso días en superficies sólidas, permaneciendo estable e infeccioso en heces humanas hasta por una semana. Las personas con rotavirus excretan grandes cantidades de partículas virales antes de que se den episodios de sintomatología de la enfermedad, durante todo el curso de la diarrea y hasta una semana después de que los síntomas terminan, y aún muchas personas excretan el virus sin presentar diarrea. Pero es el contagio a través de las manos de persona a persona el posible responsable de diseminar el rotavirus en ambientes cerrados, como hogares, hospitales y guarderías en donde en éstas últimas se da el contacto directo y mediante alimentos o juguetes contaminados (82, 83).

El periodo de incubación viral es de 2 días, luego se presenta vómito y diarrea (en un periodo que abarca de 3 a 8 días), que lleva a una deshidratación isotónica, así como fiebre y dolores abdominales que ocurren frecuentemente hasta causar deshidratación severa o la muerte en algunos casos (83). Como con otros virus respiratorios y entéricos, existe un comportamiento por temporadas. Esto es particularmente evidente en zonas templadas, donde los rotavirus son probablemente responsables de un aumento en las muertes por diarrea durante la época de invierno. En los climas tropicales existe una tendencia mucho menos marcada en los cambios de incidencia por temporadas, aunque es más prevalente en los meses más fríos y secos (84).

En Colombia, la diarrea es una de las 5 primeras causas de consulta y hospitalización en niños menores de cinco años. Al igual que en otros países, el rotavirus es uno de los principales agentes etiológicos; sin embargo, siendo Colombia un país en transición epidemiológica, el impacto de la infección se genera tanto por mortalidad, como por morbilidad (consultas externas y hospitalizaciones), debido a cuadros moderados o severos de la enfermedad. El rotavirus circula ampliamente en todo el país, sin que influya la altura sobre el nivel del mar, humedad, precipitación o temperatura de las ciudades,

afectando a la población infantil independientemente del estado socioeconómico de la familia. Los serotipos G1, G2 y G3 y los genotipos P[4] y P[8], ocasionaron más del 60% de las infecciones (85).

1.2.6 Interacción virus-célula: adsorción y penetración

La entrada de rotavirus a la célula parece ser un proceso de múltiples etapas durante el cual se producen al menos tres contactos entre el virus y los receptores celulares. (86) Se han propuesto varias proteínas celulares como receptores de las diferentes cepas de rotavirus (ver **Tabla 4**). *In vivo*, los rotavirus tienen un tropismo celular específico, infectando principalmente enterocitos maduros de la vellosidad del intestino delgado, sugiriendo que estas células contienen receptores específicos para la unión o entrada del virus. Sin embargo, reportes recientes sugieren que la replicación extra intestinal del virus ocurre durante la infección (87), indicando un rango más amplio de tejidos del huésped a los que previamente se pensaba. *In vitro*, los rotavirus se unen a una amplia variedad de líneas celulares, aunque solo una subpoblación de éstas es eficientemente infectada (incluyendo células de origen renal como las MA104 o intestinal como las Caco2), aunque al introducirlo por lipofección, en líneas celulares no susceptibles, el virus se replica de manera similar a como lo hace en las permisivas, sugiriendo que son los receptores los que determinan la susceptibilidad o no (71).

Recientes estudios han demostrado que mientras la infección sistémica no se da, raramente ocurre viremia e infección extra intestinal por rotavirus, tanto en humanos como en animales (88). La inyección intraperitoneal de rotavirus de mono rhesus (RRV) en ratones recién nacidos resulta en atresia biliar, una condición influenciada por la respuesta tipo interferon del hospedero. Se ha estudiado la inoculación oral en ratones lactantes de 5 días de edad deficientes en la respuesta a interferon encontrando una replicación sistémica de RRV, sin embargo no ocurre lo mismo con el rotavirus murino ECWt, sugiriendo que se requiere de interferon sistémico para inhibir la replicación intestinal y extra intestinal por diferentes cepas de rotavirus (89). Los receptores virales son uno de los determinantes de rango de hospederos y de tropismo celular; la unión del virus a la célula puede ser un proceso de varios pasos, en los que el virus se une a más de una molécula celular. Estos receptores múltiples pueden actuar en conjunto para modular o complementar sus funciones, pero también pueden ser pasos secuenciales en los que la

unión del virus a un primer receptor puede inducir cambios conformacionales que le permiten unirse al siguiente receptor (87). La unión de algunos rotavirus de origen animal con su célula hospedera se lleva a cabo a través de la interacción del virus con ácido siálico (AS) que está presente en la superficie de la célula, ya que el tratamiento de las células con neuraminidasa (enzima que remueve AS de la membrana) o la pre-incubación del virus con la glicoforina (glicoproteína con alto contenido de residuos de AS), reduce la unión del virus a la célula en forma significativa, con la consecuente reducción en la infectividad viral (90).

Se ha reportado que VP4 contiene secuencias motivo que interactúan con las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$, mientras que VP7 contiene sitios de unión para las integrinas $\alpha \beta 2$ y $\alpha 4\beta 1$. Se ha demostrado que anticuerpos para estas integrinas, así como los péptidos que contienen motivos de unión, bloquean la infectividad de rotavirus resistentes y sensibles a neuraminidasa (NA), sugiriendo la posibilidad de que estas integrinas actúen como receptores del virus (25, 91). La integrina $\alpha \beta 3$ también juega un papel en la unión y entrada de rotavirus dentro de las células, aunque la secuencia motivo de unión RGD esté ausente de las proteínas de la capa externa del virus. Las integrinas probablemente no son los receptores primarios de los rotavirus ni son normalmente internalizadas, pero dicha interacción puede ser requerida para eventos de señalización necesarios para iniciar la infección o la entrada del virus, aunque ha sido recientemente sugerido que algunas cepas de rotavirus pueden infectar la célula independientemente de las integrinas. Adicionalmente, la proteína de choque térmico constitutiva Hsc70 ha sido también implicada como un receptor post – unión para cepas de rotavirus tanto resistentes como sensibles a NA (87). Un trabajo reciente en nuestro laboratorio indica que la proteína PDI se encuentra en la membrana de las células MA104 (31) y otro trabajo también indica que está en la membrana del enterocito de ratón (92) los dos trabajos indican que PDI está implicada en el proceso de entrada del rotavirus a dichas células (31, 92).

Tabla 4. Receptores celulares asociados a la infección rotaviral.

Molécula	Proteína viral	Etapas	Referencia
SA/gangliosido	VP8	Unión	(93, 94)
$\alpha 2\beta 1$	VP5	Unión y post-unión	(24, 25)
$\alpha 4\beta 1$	VP5	Post-unión	(26, 95)
$\alpha 4\beta 7$	VP7	Post-unión	(96)
$\alpha X\beta 2$	VP7	Post-unión	(97, 98)
$\alpha V\beta 3$	VP7	Post-unión	(98, 99)
PDI	VP6, VP7	Post-unión	(92, 100)
Hsc70	VP5, VP6	Post-unión	(28, 29, 92, 99)

1.2.7 Ciclo de infección

El ciclo de infección de rotavirus se inicia cuando éste se une a un receptor de la superficie celular, y la replicación se lleva a cabo en el citoplasma de la célula a infectar. La partícula viral es infecciosa cuando está como TLP, y posee a VP4 y VP7, las proteínas presentes en la capa más externa las que le permiten unirse y penetrar la célula. Durante la infección, todas las proteínas virales se acumulan en el viroplasma, a excepción de las dos glicoproteínas VP7 y NSP4, que se localizan en el retículo endoplásmico (RE), y las proteínas no estructurales NSP1 y NSP3, que se distribuyen en el citoplasma celular en asociación con el citoesqueleto. Se inicia la producción y la salida de mRNA en las partículas de doble capa (DLPs), que aunque no son partículas infecciosas si son transcripcionalmente activas y se presentan cuando la capa más externa es removida como parte del proceso de entrada del virus a la célula hospedera. Los RNAs de polaridad positiva son sintetizados por la RNA polimerasa viral, cumplen dos funciones, una como mRNAs para la traducción de 6 proteínas estructurales virales y 5 no estructurales, y la segunda como moldes para la síntesis de los RNAs negativos formando así el RNA genómico. Se ha propuesto que mediante las uniones simultáneas del extremo 3' de los mRNA virales y del factor eIF4G1, NSP3 favorece la síntesis de las proteínas virales e interfiere con la traducción de los mRNA celulares a medida que progresa la síntesis de las proteínas virales, se disminuye la síntesis de las proteínas celulares, la cual finalmente se abate casi en su totalidad (87). La selección, el empaquetamiento, y la replicación de

los segmentos del genoma, así como parte de la morfogénesis del virión, se llevan a cabo en estructuras electrodensas citoplasmáticas, denominadas viroplasmas, que están compuestos, entre otras cosas, de RNA y de proteínas virales. Una vez formadas las DLPs, éstas abandonan el viroplasma, y adquieren la capa externa al gemar a través de la membrana del RE. Durante el proceso de gemación los virus son envueltos por una membrana lipídica transitoria que se pierde conforme las partículas migran dentro del RE y ésta es reemplazada por la capa de proteínas (VP7 y VP4) a través de un mecanismo que se desconoce aún. Recientes evidencias sugieren que VP4 se integra al virión fuera del RE en un evento reticular post – endoplasmático asociado a microdominios rafts para formación de los viriones maduros y liberación de la célula a través de una ruta no convencional que omite el aparato de Golgi en células polarizadas o por lisis celular (77).

1.2.8 Estabilidad y viabilidad del rotavirus

1.2.8.1 Susceptibilidad a fármacos: aunque las vacunas actuales contra el rotavirus han demostrado una buena tolerancia y una significativa eficacia, resulta útil desarrollar estrategias alternas o complementarias destinadas a prevenir o tratar los procesos infecciosos generados por el rotavirus, puesto que la vacuna solo atenúa los síntomas y los signos, pero no los suprime. Se puede decir que la susceptibilidad a medicamentos es en general desconocida (87), aunque recientemente trabajos del Laboratorio de Biología molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia han mostrado una disminución de la infectividad de los rotavirus RRV, Wa, Wi o M69 ante el tratamiento con reactivos que inhiben la actividad tiol / disulfuro en células MA104 y en células Caco-2 tales como N-acetil cisteína (NAC), pioglitazona y ácido ascórbico (vitamina C) (31, 101).

1.2.8.2 Susceptibilidad a los desinfectantes: El rotavirus humano, ya sea en suspensión o presente en superficies inanimadas, es susceptible al glutaraldehído (2%); desinfectantes clorados (> 20.000 ppm de cloro); desinfectantes yodados (> 10.000 ppm de yodo); combinaciones de compuestos de amonio cuaternario con alcoholes (> 40%), algunos ácidos (HCl), algunas bases (metasilicato de sodio), y combinaciones de compuestos fenólicos con tenso activos aniónicos fuertes (102, 103). Se requieren tiempos de exposición más largos para la desinfección de superficies contaminadas con respecto a soluciones contaminadas con rotavirus en suspensión (104).

1.2.8.3 Inactivación física: El rotavirus humano es susceptible a ácidos fuertes (pH <3,0)(105). También es susceptible al calentamiento por encima de 50 °C (durante 30 minutos)(106).

1.2.8.4 Supervivencia fuera del hospedero: El rotavirus humano puede sobrevivir a temperatura ambiente (30-35 °C) y puede seguir siendo infeccioso en objetos inanimados hasta por 60 días, tiende a ser estable con niveles de humedad bajos o intermedios (107).

1.2.9 Riesgos de laboratorio

1.2.9.1 Infecciones adquiridas en el laboratorio: No hay casos de infección adquirida en el laboratorio reportados hasta la fecha (108).

1.2.9.2 Fuentes/Muestras: Las principales fuentes de rotavirus humanos son la mucosa intestinal y extractos de heces de personas infectadas (109). También se ha detectado en hisopos rectales de pacientes humanos infectados (108).

1.2.9.3 Riesgos principales: Ingestión de heces o muestras de heces y otros materiales contaminados. Exposición de las membranas mucosas a gotitas contaminadas. La importancia de la exposición a aerosoles también puede presentar un riesgo primario (87).

1.2.10 Control de exposición / protección personal

1.2.10.1 Clasificación grupo de riesgo: Grupo de riesgo 2 (110).

1.2.10.2 Requisitos de contención: Instalaciones con nivel de contención 2, equipos y prácticas operativas para el trabajo con materiales, animales o cultivos infecciosos o potencialmente infecciosos (111).

1.2.10.3 Ropa de protección: Bata de laboratorio. Guantes para evitar el contacto directo de la piel con materiales o animales infectados. Se debe utilizar protección para los ojos donde hay un riesgo conocido o potencial de exposición a salpicaduras (110).

1.2.10.4 Otras precauciones: Todos los procedimientos que pueden producir aerosoles, o se requieran altas concentraciones o grandes volúmenes deben llevarse a cabo en

cabinas de seguridad biológica (BSC). El uso de agujas, jeringas y otros objetos punzantes debe ser estrictamente limitado (110).

1.3 Proteínas de choque térmico

1.3.1 Generalidades de las HSPs

Las proteínas de choque térmico (HSPs) también conocidas como proteínas de estrés descubiertas en 1962 (112), son una gran familia de proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución y son expresados por procariontes y eucariotes. Las HSPs controlan la biogénesis de las proteínas permitiendo el correcto plegamiento de los polipéptidos recién formados, oligomerizando el ensamblaje de estas, y translocando intracelularmente a las proteínas que se están formando y son cruciales en mantener la homeostasis celular(113). Las proteínas de choque térmico también previenen la agregación inapropiada inducida por el estrés, facilitando la reparación de las proteínas desnaturalizadas o promoviendo su degradación. Como resultado de estos roles, las HSPs también han sido denominadas como “chaperonas moleculares” (114). Las HSPs se clasifican con base en su peso molecular, expresado en kDa así: Hsp15–30, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and Hsp100 (ver [Tabla 5](#)), cada una de las familias de las HSPs está compuesta por varias moléculas, todas tienen una estructura primaria similar y la habilidad de desempeñar funciones análogas en diferentes compartimentos subcelulares(115). Las HSPs son llamadas así porque su expresión es inducida por el choque térmico (112), sin embargo hay una serie de factores ambientales y metabólicos que son capaces de inducir un aumento en su expresión e incluyen la hipoxia, daño oxidativo, privación de glucosa, exposición a metales pesados o agentes antitumorales(114). Esta respuesta incluye incrementar las síntesis de HSPs, lo que se ha detectado en muchas condiciones fisiopatológicas como daño y reparación tisular, hipertrofia, fiebre, inflamación, infección viral o bacteriana (113).

1.3.2 Familias de las HSPs

1.3.2.1 Familia de las HSPs pequeñas

Presentan un peso molecular entre 15 y 30 KDa, son ubicuas y altamente conservadas. Se conocen tres isoformas, aunque su función ha sido poco caracterizada, se conoce que se sobre expresan bajo condiciones de choque térmico y contribuyen a mantener la viabilidad celular, manteniendo la conformación nativa de las proteínas citosólicas de manera independiente de ATP (116).

Hsp22: también conocida como α - B cristalina o Hsp β -8, es codificada por el gen HSPB8 localizado en el cromosoma 12 (117) y se encuentra en todas células del cuerpo aunque es particularmente abundante en las células nerviosas. Parece interactuar con la Hsp27 (Hsp β -1) en las células nerviosas ayudando a organizar la red de neurofilamentos de los axones (118).

Hsp25: es codificada por el gen HSPB1 localizado en el cromosoma 7 (119), está presente en fibras musculares estriadas con alta capacidad oxidativa, como el corazón, músculo esquelético y se localiza en las bandas Z. Sin embargo, su localización parece depender de las condiciones fisiológicas, por ejemplo el calor o la isquemia disparan su translocación al núcleo, su agregación y la interacción específica con las bandas Z del sarcómero (120). La expresión de los genes que codifican para esta proteína está relacionadas con la respuesta a hormonas esteroideas, siendo regulados por los estrógenos (120, 121).

Hsp27: es producida por el gen HSPBAP1 del cromosoma 3 y fue originalmente denominada Hsp β -1 o proteína de respuesta a estrés srp-27 (122). Se expresa en órganos sensibles a estrógenos como el útero, la vagina y piel, con cambios significativos en su localización y cuantificación, durante las diferentes fases del ciclo menstrual (123). Se encuentra en el cordón umbilical y en menor nivel en la placenta, sugiriendo circulación materno fetal (124). Participan en termotolerancia, proliferación celular, resistencia a drogas, polimerización de actina y como chaperona (125, 126). Estaría involucrada en el transporte del receptor estrogénico desde el citoplasma al núcleo por medio de un mecanismo dependiente de actina (127).

1.3.2.2 Familia HSP40

Esta familia es codificada por cerca de 44 genes HSPF1 localizados en los cromosomas 3 y 19 (128, 129). Contribuyen al plegamiento y previenen la agregación de las proteínas; actúan junto con la Hsp70, actividad que es regulada por la hidrólisis del ATP en su sitio activo. Pueden actuar como chaperona por sí solas y se encuentran localizadas principalmente en el retículo endoplásmico. Esta familia se clasifica en 3 subfamilias de A-C o tipo I, II y III. La subfamilia A está constituida por las proteínas con los cuatro dominios antes mencionados, tiene actividad chaperona autónoma y puede interactuar o no junto con Hsp70. La subfamilia B contiene proteínas que carecen del dominio rico en Cisteínas y la subfamilia C tiene sólo el dominio J que no se sitúa necesariamente en el extremo N-terminal; estas dos últimas subfamilias dependen totalmente de la actividad de Hsp70(130).

1.3.2.3 Familia HSP60

Son una familia de chaperonas mitocondriales codificadas por dos genes HSPD1 localizados en el cromosoma 2 (131). Se encuentran localizadas principalmente en la mitocondria e incluso se ha encontrado en la membrana citoplasmática de algunas células. Son responsables del transporte y plegamiento de proteínas desde el citoplasma hacia la matriz mitocondrial (132).

1.3.2.4 Familia HSP70

Está codificada por 13 genes localizados en los cromosomas 1, 5, 6, 9, 14 y 21 (133, 134) y son abundantes en células eucariotas, donde actúan como chaperonas. En cooperación con otras chaperonas (Hsp40, Hsp90 y Hsp110), se unen a los segmentos hidrofóbicos de los polipéptidos en formación durante la traducción y translocación de los mismos hacia los diferentes compartimentos subcelulares. Se encuentran localizadas en el citoplasma así como dentro de algunos organelos. Participan en la eliminación de las proteínas dañadas o defectuosas mediante la interacción con la proteína de interacción con el extremo C-terminal de Hsp70 (Proteína CHIP) que es una E3 ubiquitin ligasa (135).

1.3.2.5 Familia HSP90

Están codificadas por 17 genes agrupados en 4 clases (HSP90AA, HSP90AB, HSP90B y TRAP, localizados en los cromosomas 1, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 15 y 16 (136). Se encuentra en el citoplasma, en la superficie celular e incluso es excretada extracelularmente y constituye una de las proteínas más abundantes de la célula (137, 138). Se han encontrado más de 100 proteínas que son reguladas por la Hsp90 dentro de las que se incluyen proteínas Akt, Neu/Her-2 (ErbB2), HIF-1 α , Bcr-ABI, Raf-1 y p53 mutado (139). Muchas de estas proteínas son importantes mediadores de la transducción de señales y control del ciclo celular, por ende la Hsp90 ha sido involucrada como una de las principales HSPs en el desarrollo y progresión tumoral.

1.3.3 Relación de HSPs y cáncer

Un gran número de evidencias muestra que las HSPs pueden estar involucradas en un importante número de procesos cruciales en el desarrollo tumoral como por ejemplo en la regulación de la progresión del ciclo celular (140), control de las vías apoptóticas (141) y en la vigilancia inmune contra el cáncer (142, 143). La sobreexpresión de HSPs se ha observado en neoplasias de roedores, caninos y humanos, indicando que las HSPs tienen un rol en la carcinogénesis y metástasis (144). En la actualidad, se han desarrollado estudios de proteómica en varios tipos de células tumorales de origen primario o Metastásico, incluyendo SH-SY5Y (neuroblastoma), A549 (adenocarcinoma pulmonar), el adenocarcinoma de colon LoVo, la leucemia linfoblástica aguda de células B, Sup-B15 y en las células de tumor de ovario. Se han identificado en la membrana citoplasmática CD87, el receptor de activina tipo IIB, CD98 y proteínas chaperonas incluyendo Grp78, GRP75, HSP70, HSP60, HSP54, HSP27, y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (145).

Tabla 5. Familia de las proteínas de choque térmico (HSPs).

Familia	Nombre	Localización celular	Función	Co-chaperona	Referencia
Pequeñas HSPs	p20	Citoplasma	Vaso relajación	Ninguna	(146)
	Hsp22o α B-cristalina	Citoplasma/Núcleo	Estabilización del citoesqueleto		
	Hsp27 (humana)	Citoplasma/Núcleo	Dinámica de la Actina		
Hsp40	Hsp40	Citoplasma	Chaperona	Ninguna	(130)

	Hsp47	Ret. Endoplásmico	Control de síntesis del colágeno		
Hsp60	Hsp58	Mitocondrias	Chaperona	Hsp10	(147, 148)
	Hsp60	Mitocondrias	Chaperona		
Hsp70	Hsc70 (73)	Citoplasma	Chaperona	Hsp40, GrpE, BAG, HSPBP1, Hip, Hop, CHIP	(132, 149)
	Hsc70 (72)	Citoplasma/Núcleo	Chaperona		
	Hsp75	Mitocondria	Chaperona		
	Grp78	Ret. Endoplásmico	Chaperona		
Hsp90	Hsp90 α (86)	Citoplasma	Unión a receptores de esteroides	p23, Hop, FKBP51, FKBP52, Cyp40, cdc37	(132, 149-151)
	Hsp90 β (84)	Citoplasma	Unión a receptores de esteroides		
	Grp94	Ret. Endoplásmico	Chaperona		
Hsp110	Hsp105	Citoplasma	Chaperona citoprotectora	Ninguna	(152)
	Hs0110	Nucléolo/citoplasma	Chaperona Citoprotectora		

Los números entre paréntesis corresponden a otras denominaciones de las mismas proteínas. Grp: proteínas relacionadas con glucosa, inducidas por anoxia y privación de glucosa.

Numerosas neoplasias humanas presentan sobreexpresión de HSPs, este hallazgo estaría relacionado con la proliferación de las células tumorales, el establecimiento de metástasis y en algunos casos con resistencia a drogas quimioterapéuticas (144). Las células tumorales, al migrar a los ganglios linfáticos encuentran un microambiente hostil, por lo tanto sobre expresan estas proteínas citoprotectoras que favorecen su supervivencia y su posterior diseminación a todo el organismo (153). Algunos autores encuentran correlación entre sobreexpresión de HSPs con el desarrollo de células neoplásicas, por ejemplo se han relacionado los niveles de Hsp10, 27, 40, 60, 70, 90 y 110 que son más altos en pacientes con tumor y metástasis en relación con población normal. Se involucra también a Hsp70 y 90 pues evitan la senescencia celular, de esta manera las HSPs pueden ser usadas como marcadores diagnósticos y pronósticos (154-157). Sin embargo, estudiando individualmente los distintos tipos de neoplasias, la relación no es tan directa y los resultados son contradictorios.

En la literatura se encuentra reportada la interacción de las proteínas rotavirales VP5 y VP6 con la Hsc70, entre ellas se reporta que la formación del complejo entre Hsp90 y Hsp70 de membrana citoplasmática participa en la entrada del virus del dengue como un

receptor en líneas celulares y en monocito/macrófagos humanos (158). Hsp70 interactúa con la ribonucleoproteína (RNP) del virus de la influenza regulando la transcripción y replicación, durante la infección Hsp70 se trasloca del citoplasma al núcleo (159). La proteína no estructural 5A (NS5A) del virus de la hepatitis C humana (HCV) co-precipita con las proteínas Hsp40 y Hsp70 y así mismo colocalizan en ensayos de microscopía confocal, adicionalmente al transfectar las células con un siRNA para Hsp70 y Hsp40 se reduce la infección (160). La Hsp90 en un proceso dinámico que depende de la hidrólisis del ATP, facilita la interacción entre la retrot transcriptasa (RT) y la proteína épsilon del virus de la hepatitis B humana (161). La proteína nef del virus de la inmunodeficiencia humana tipo1 (HIV-1) interactúa con la Hsp40 facilitando la expresión de genes virales a través de la inducción de la ciclina dependiente de quinasas 9 (Cdk9) (162).

1.4 Integrina $\beta 3$

1.4.1 Generalidades de las integrinas

Las integrinas constituyen una gran familia de receptores heterodiméricos transmembranales de superficie celular que se encuentran en muchas especies animales, que van desde las esponjas hasta los mamíferos. Las integrinas están compuestas por dos subunidades, una α y una β y cada combinación tiene sus propias características y propiedades de unión y señalización. La mayoría de las integrinas reconocen y se unen a varias proteínas de la matriz extracelular. Por el contrario, proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina, laminina, colágeno y vitronectina, se unen a varias integrinas (163). Las integrinas median la interacción entre moléculas de adhesión entre células adyacentes y/o a la matriz extracelular (164). La integrina $\alpha V\beta 3$ forma parte de dos heterodímeros y está implicada en una amplia variedad de funciones fisiológicas y patológicas importantes incluidas la migración celular, diferenciación celular y apoptosis, estas actividades pueden regular la metástasis y potencialmente la invasividad de células tumorales (165). Se ha involucrado a las integrinas en el desarrollo de procesos neoplásicos dado que las células no tumorales (exceptuando algunas células del sistema hematopoyético), deben anclarse adecuadamente a una matriz extracelular para sobrevivir, dependiendo en gran parte de señales generadas por la matriz; cuando esta regulación se pierde, se pueden generar estímulos de proliferación celular y pérdida en la diferenciación

inducida por ellas, justamente este requisito de anclaje se pierde en las células neoplásicas (166). Se ha demostrado que algunos virus usan la proteína $\alpha V\beta 3$, por ejemplo, la glicoproteína H (gH) del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) que es una de las glicoproteínas que son esenciales para el ingreso del virus a la célula contiene los motivos RGD (Arg-Gly-Asp) e interactúa con la integrina $\alpha V\beta 3$ en células Vero y CHO (167). La integrina $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ se unen a la proteína fibrilar de 186 kD del adenovirus humano y cuando se transfectan con estas integrinas a células que carecen de las mismas, el adenovirus puede ser internalizado (168). El faringo virus humano tipo 1 (HPEV-1) contiene motivos RGD (Arg-Gly-Asp) que son reconocidos por la integrina $\alpha V\beta 3$ y al emplear extractos solubles de proteínas provenientes de células A549, el virus co-inmunoprecipita con la integrina $\alpha V\beta 3$, así mismo al emplear anticuerpos monoclonales contra la integrina $\alpha V\beta 3$ se reduce la infectividad en un 85 % en este mismo modelo, en este mismo estudio se emplearon células CHO que naturalmente no son susceptibles a la infección por el virus y fueron transfectadas con la integrina $\alpha V\beta 3$ permitiendo la infección por parte del HPEV-1 (169).

1.4.2 Estructura de las integrinas

Las integrinas son heterodímeros obligados que contienen dos tipos de cadenas distintas, la subunidad α (alfa) y la subunidad β (beta), que se unen de forma no covalente. Las cadenas α contienen aproximadamente entre 1.000 y 1.200 residuos, en cambio las cadenas β tienen entre 760 y 790 residuos. En los mamíferos, se han caracterizado 18 subunidades alfa y 8 subunidades beta, mientras que el genoma de *Drosophila* codifica únicamente cinco subunidades alfa y dos beta, y el nematodo *Caenorhabditis* dos alfa y dos beta. Ambas subunidades poseen dos extremos separados, que penetran en la membrana plasmática y tienen pequeños dominios citoplásmicos. Además, variantes de algunas de las subunidades son formadas por splicing alternativo, como por ejemplo, las 4 variantes de la subunidad beta 1. Por medio de diferentes combinaciones de estas subunidades alfa y beta, se generan 24 integrinas únicas (170). La **Ilustración 6**. muestra la estructura fundamental de las integrinas.

Las subunidades de las integrinas quedan incluidas en la membrana plasmática y en general, tienen dominios citoplásmicos muy cortos, de unos 40-70 aminoácidos. Fuera de

la membrana plasmática de la célula, las cadenas alfa y beta se sitúan bastante cerca entre sí, a una distancia de unos 23 nm. El extremo N-terminal de cada cadena forma una región de unión a ligando.

La masa molecular de las integrinas puede variar de 90 a 160 kDa. Las subunidades β tienen secuencias repetidas ricas en cisteínas. Tanto la subunidad α como la β pueden unir diversos cationes divalentes. El papel de la subunidad α es desconocido, pero podría estar implicada en la estabilización del plegamiento de las proteínas. La subunidad β es más interesante, ya que está directamente involucrada en la coordinación algunos ligandos que se unen a la integrina.

Ilustración 6. Estructura general de las Integrinas.

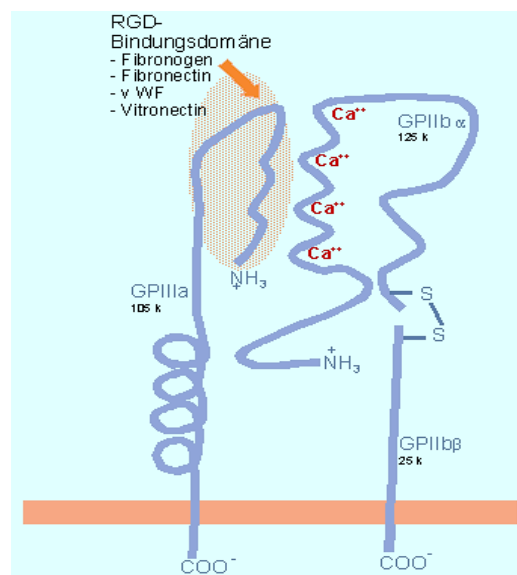


Ilustración 6. Estructura general de las Integrinas. En gris las cadenas alfa y beta. La flecha Naranja indica el motivo de unión RGD. En rojo los Cationes divalentes que se unen a la cadena Beta. Tomado de Xiong JP (2001). «Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha v \beta 3$ ». *Science* **294** (5541): pp.339–345.(170)

1.4.3 $\alpha v \beta 3$ integrina y cáncer

Numerosos estudios han demostrado que la $\alpha v \beta 3$ integrina es un receptor que afecta el crecimiento del tumor, la invasión local y el potencial metastásico (166). Esta glicoproteína dimerica transmembrana media la adhesión y migración de células tumorales a través una variedad de proteínas de la matriz extracelular, al igual que otras integrinas la $\alpha v \beta 3$ reconoce la secuencia tripeptídica RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico). Además, la $\alpha v \beta 3$ integrina se expresa fuertemente en células endoteliales activadas y juega un papel

fundamental en el proceso angiogénico (171). En contraste, la expresión de la $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ integrina es débil en células endoteliales no activadas y en la mayoría de los sistemas orgánicos normales, por lo tanto, la inhibición de la $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ integrina es actualmente evaluada como una nueva estrategia específica para la terapia antitumoral (172). La afinidad de las integrinas a diferentes ligandos es críticamente determinada por la conformación de este motivo de unión común, entonces el diseño de péptidos con motivos RGD con la conformación correspondiente permite el señalamiento selectivo de integrinas específicas. La inhibición de la función de la $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ integrina por antagonistas peptídicos y no peptídicos inhibe el crecimiento tumoral en estudios con modelos animales (173, 174). La futura evolución de terapias dirigidas contra la $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ integrina puede brindar una herramienta para lucha contra el cáncer.

1.5 Proteína disulfuro isomerasa (PDI)

1.5.1 Generalidades de la PDI

El plegamiento proteico celular es asistido con la ayuda de catalizadores que aceleran el plegamiento de las proteínas y chaperonas que inhiben la agregación (175). Sin embargo, cuando el proceso de plegado no funciona correctamente, puede ser catastrófico para la célula. El mal plegamiento de una proteína, obviamente, puede conducir a una pérdida de su función, pero las proteínas mal plegadas que se acumulan en grandes agregados insolubles también pueden interferir con la función celular. La célula cuenta con mecanismos de protección contra el mal plegamiento de proteínas que incluyen las chaperonas y los catalizadores de plegamiento para inhibir la agregación y estimular plegamiento junto con los sistemas de degradación de proteínas, a este sistema pertenecen las PDIs (176).

Las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs) constituyen una familia de proteínas estructuralmente relacionadas, involucradas en el correcto plegamiento de nuevas proteínas sintetizadas en el ribosoma, catalizando la formación y remodelación de los puentes disulfuro en el retículo endoplásmico rugoso (RER), asegurando así la correcta formación de puentes disulfuro (177). Las PDIs actúan como chaperonas y por ello hacen parte del sistema de control del correcto plegamiento de las proteínas en el RER. También

las proteínas secretadas y las de la superficie celular son a menudo estabilizadas por enlaces disulfuro (176).

La información específica para el apareamiento de los enlaces disulfuro, se encuentra en residuos de cisteínas, que están vinculados en el plegamiento y en la formación de la estructura terciaria. Durante el proceso inicial de plegamiento, la formación de puentes disulfuro es propensa a errores, debido a las cisteínas mal conectadas (177). La célula eucariota resuelve este problema con un ambiente redox especializado en el retículo endoplásmico (ER), allí la célula está equipada con catalizadores de la formación de puentes disulfuro y la isomerización (175). La proteína disulfuro isomerasa (PDI) es un catalizador esencial de este plegamiento y puede catalizar la oxidación, reducción e isomerización de grupos tiol/disulfuro (177).

1.5.2 Estructura de la PDI. (EC 5.3.4.1)

La familia de las PDIs está constituida por 19 miembros cuya característica común es contener una secuencia señal predictiva y al menos un dominio tipo tiorredoxina; a su vez esta familia pertenece a la superfamilia de enzimas tiorredoxina, la cual incluye las tiorredoxinas, las glutarredoxinas humanas y DsbAs en bacterias. Las PDIs poseen uno o más dominios relacionados con la tiorredoxina del citoplasma, presentando al menos un dominio que contiene el motivo redox (104). PDI contiene dos dominios tiorredoxina, **a** y **a'**, que están separados por dos dominios no catalíticos **b** y **b'** (ver [Ilustración 7](#)). Los dominios catalíticos contienen un sitio activo motivo CXXX, los aminoácidos que se encuentran entre residuos cisteína tienen el mayor rol determinante en el potencial redox de la enzima y la función tiosulfuroreductasa, oxidasa o isomerasa. Las proteínas de la familia PDI se caracterizan por que tienen una estructura multi dominio. Para la proteína PDI (EC 5.3.4.1) el tamaño del polipéptido maduro en mamíferos es de 490 aminoácidos, que incluye un NH₂-terminal con una secuencia señal del RE y un COOH-terminal con una secuencia señal KDEL de permanencia en el lumen del RE. Esta abundante proteína de 55 kDa, cataliza la formación de puentes disulfuro dentro de las proteínas (oxidasa) y cataliza la reorganización de disulfuros incorrectamente realizados (actividad isomerasa) (178).

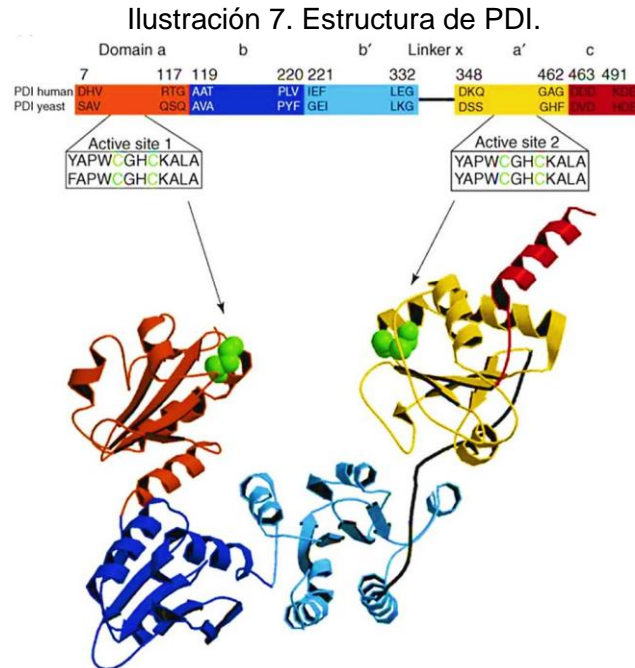


Ilustración 7. Estructura de PDI. **a)** Esquema basado en de diversos modelos de la estructura cristalina de la PDI humana y PDI de levadura (*S. cerevisiae*, AP ID código 2B5E), la arquitectura de PDI consta de cinco dominios y un enlazador (linker) organizados en orden desde abb'xa'c. Los residuos se enumeran de acuerdo a la estructura de la PDI humana madura (*H. sapiens* código SwissProt P07237). Los límites del dominio se basan en la estructura cristalina de levadura, los residuos fronterizos y los dos dominios del sitio activo (que se muestra en detalle en las cajas) están alineados para PDI humana (arriba) y levadura (abajo). Los dominios a (naranja) y a' (amarillo) son homólogos a TRX y contienen el motivo catalítico CxxC (verde). Los dominios b (azul oscuro) y b' (azul claro) también adoptan un plegamiento TRX, pero no comparten gran similitud de secuencia entre sí o con los dominios a o a'. La región flexible x del enlazador (linker) (negro) se encuentra entre los dominios b' y a'. El enlace entre los dominios a y b es de tan sólo un residuo. El extremo C-terminal (rojo) contiene una señal de retención (K/H) DEL para el retículo endoplásmico (RE). **b)** Diagrama de cintas basado en la estructura cristalina de la PDI de que muestra las cisteínas del sitio activo representadas en verde llenado de espacio. Los colores de los dominios son los mismos que en **a)**. Tomado de Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci* **31**: 455-464 (178)

1.5.3 PDI de la superficie celular

Se ha demostrado que algunos miembros de la familia PDI no se encuentran confinados al RE, pues han sido encontradas en el espacio extracelular, el citosol, el núcleo y en la superficie celular; confiriéndole a aquellas presentes en la superficie celular diferentes estados conformacionales y funcionales (179, 180). Los miembros de la familia PDI localizados fuera del RE se han encontrado en muy baja concentración y en periodos de minutos (la concentración de PDI en el RE es aproximadamente de 0.2 mM). La PDI se desprende fácilmente de la membrana celular y es reemplazada por nuevas moléculas provenientes del interior de la célula (180). La PDI de la superficie se ha encontrado en

varios tipos de células tales como: células endoteliales, hepatocitos, células pancreáticas, linfocitos, plaquetas y células cancerosas (181) (182-184).

No se esperaría encontrar a la PDI en la membrana celular ya que es soluble, por ello se ha sugerido que luego de la secreción, PDI se enlaza por interacciones electrostáticas y/o interacción con otras proteínas localizadas en membrana (182). La función asignada a esta localización se relaciona con la actividad reductora del exterior celular, la PDI de la membrana celular se ha involucrado en el mantenimiento del estado reductivo de la membrana citoplasmática, también en procesos que incluyen adhesión celular, maduración de plaquetas, transporte de óxido nítrico, modulación de la actividad de la trombospondina e interacción con el ectodominio del receptor de la tirotrópina humana (185, 186). La PDI de la superficie celular ha sido implicada en la reducción de los enlaces del heterodímero de la toxina diftérica y en el ingreso del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) a las células linfoides, facilitando la reducción de enlaces disulfuro de la proteína gp120 (187). Algunos virus como el baculovirus, vaccinia, Sindbis también dependen de la actividad disulfuro isomerasa para la entrada a la célula (188, 189). La entrada del virus de la hepatitis delta (HDV) fue bloqueada por inhibidores del intercambio tiol disulfuro que no son permeables a la membrana citoplasmática, sugiriendo arreglos en las proteínas virales necesarios para el desensamblaje del virión (190). También el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) requiere el intercambio tio-disulfuro sobre la proteína de fusión como parte de los arreglos conformacionales para su activación (191).

La proteína PDI ha sido involucrada en el proceso de ensamblaje del rotavirus debido a su función chaperona y redox. Se ha encontrado que la proteína viral VP7 interactúa con PDI solo después de haber sido glicosilada en el RE, formando los enlaces disulfuro y el correcto plegamiento de VP7 en el RE (192). Algunas proteínas rotavirales contienen proteínas con residuos de cisteína sobre los cuales se pueden formar o se forman enlaces disulfuro tales como VP4 (Posiciones 203, 216, 318, 380 y 774), VP5, VP7 (4 enlaces disulfuro en las posiciones Cys82-Cys135, Cys165-Cys249, Cys191-Cys244 y Cys196-Cys207) y VP8 (enlaces en las posiciones 203-216 y 318-380) (193, 194).

1.5.4 PDI y cáncer

Es bien conocido que existe una activación de la respuesta celular al estrés mediada por el retículo endoplásmico (RE) en células tumorales para sobrevivir fuera del ambiente normal. Muchas proteínas que protegen a la célula contra el estrés del RE son activadas por PDI y muchos estudios tiene la hipótesis de que la apoptosis de la célula tumoral puede estar disminuida debido al incremento del estrés celular haciendo que se incremente la actividad de PDI. En estudios *in vitro* realizados con células de melanoma que sobre expresan PDI, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de PDI incrementa la apoptosis en respuesta a agentes que inducen estrés en el RE, sugiriendo que PDI puede estar implicada en el desarrollo de los procesos neoplásicos (195). PDI es una chaperona que juega un rol importante en el balance oxido reductor de la célula y también regula la adhesión celular dependiente de integrinas, es por ello que su papel en desarrollo de neoplasias ha sido estudiado. Se ha encontrado que PDI se sobre expresa fuertemente en células de glioma invasivo, tanto en el modelo de xenoinjerto y en muestras aisladas de pacientes humanos. Usando un ensayo de migración *in vitro*, también se encontró que PDI se expresa en gliomas que migran, identificando un rol importante de PDI en la capacidad invasiva tumoral (184).

La identificación de antígenos tumorales que contribuyan a la transformación celular y que estén vinculados con la respuesta inmune contra el tumor es un importante parámetro para el desarrollo de la inmunoterapia. Se ha estudiado la implicación de PDI en células carcinoma renal murino encontrando un incremento en la expresión y en la actividad de ERp5 (miembro de la familia de las PDI) en la membrana citoplasmática, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la misma proteína se disminuye la capacidad invasiva de estas células, también se han encontrado altos títulos de anticuerpos humanos contra PDI en pacientes con leucemia mieloide aguda, tratados con radioterapia. También se ha encontrado que PDI se expresa fuertemente en algunos tipos de tumores como en células de melanoma murino, células de glioblastoma humano invasivo (196). Todos estos hallazgos permiten revelar un papel inmunológico de PDI y abren la posibilidad de que esta proteína sirva como un blanco terapéutico para anticuerpos monoclonales.

1.6 Leucemia linfoblástica aguda

1.6.1 Generalidades

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) comprende un grupo de neoplasias malignas que afectan a los precursores (blastos) de los linfocitos en la médula ósea, siendo una enfermedad maligna clonal en la cual los precursores linfoides inmaduros proliferan y reemplazan las células hematopoyéticas normales (197). Las células malignas de la LLA son células precursoras linfoides (linfoblastos) que están detenidos en una etapa precoz del desarrollo, esta detención es causada por la expresión anormal de genes, generalmente como resultado de translocaciones cromosómicas (198). Los linfoblastos reemplazan los elementos hematopoyéticos, provocando una disminución marcada de células sanguíneas normales, provocando anemia, trombocitopenia y neutropenia, en grados variables. Los linfoblastos también proliferan en órganos diferentes a la médula ósea, particularmente el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos, los que infiltran (199). La LLA se diferencia de otras neoplasias linfoides por el inmunofenotipo de las células leucémicas, que es similar al de los precursores de los linfocitos B y T. La mayoría son neoplasias de células progenitoras de precursores B aunque ocasionalmente se encuentran LLA de células precursoras T (200).

1.6.2 Epidemiología

La leucemia linfoblástica aguda es la forma más frecuente de neoplasia en niños y jóvenes, representando el 32% de las neoplasias en menores de 15 años y 26% en menores de 20 años (201). El pico de incidencia ocurre entre los 2-5 años de edad y es más común en varones blancos, situación que se ha incrementado en las últimas 2 décadas (202). El riesgo de leucemia es más alto en países industrializados como se observa en EEUU, Italia, Australia, Suiza y Japón, y más bajo en África y Asia (203). La leucemia representa cerca de la tercera parte de las neoplasias en niños y corresponde hasta el 80% a leucemia linfoblástica B, 17% a leucemia mieloide aguda, y el porcentaje restante a leucemias agudas y crónicas poco frecuentes (204).

Aproximadamente 75% de las LLA de precursores B se presenta en niños menores de 6 años, sin predominio de ningún género. Por el contrario, las LLA de precursores T se

presentan con mayor frecuencia en adolescentes y niños mayores, con predominio de género masculino (199). En relación con la raza, la LLA es más frecuente en población blanca que negra con razón 10:6, y en los EEUU se observa con mayor frecuencia entre los latinos (203). El número de pacientes en Colombia con diagnóstico de LLA podría ser alrededor de 450 casos nuevos por año, extrapolarlo esta cifra de acuerdo a la población infantil colombiana menor de 16 años. En Colombia actualmente se considera a la LLA como una enfermedad de interés en salud pública, objeto de intervenciones como la vigilancia intensificada por parte del sistema general de seguridad social, con el propósito de disminuir la mortalidad y mejorar la oportunidad en el diagnóstico y atención integral de los niños con esta patología (205). La leucemia linfoblástica de linaje B presenta tasas de curación de alrededor del 80%, en países desarrollados, sin embargo, en países en desarrollo, las tasas de curación están alrededor del 40%, mientras que su contraparte mieloide alcanza escasamente el 40-50% de éxito (201). La mortalidad ha sido calculada en 0.5 por 100000 habitantes ajustado por edad, con ligero incremento en el género masculino con 0.6 por 100000. La tendencia de incidencia se mantiene para la mortalidad en lo concerniente a raza (203).

1.6.3 Etiopatogenia

La etiología de las leucemias linfoblásticas es aún poco conocida, pero se ha postulado que se debe a una mezcla de condiciones entre las que se encuentran la regulación a la baja de genes supresores tumorales y a la alta de oncogenes, sumados a la presencia de un agente medioambiental desencadenante (203). Hay evidencia que sugiere un factor genético en algunos casos (198), y otras que están relacionadas con enfermedades específicas como el síndrome de Down o la anemia de Fanconi (202, 204). Aparentemente, la leucemia se inicia con un evento *in-útero*, el cual se ha demostrado por análisis molecular de células mononucleares de muestras de sangre de cordón luego del nacimiento (206); dichas alteraciones, después de varios años, son expresadas de igual modo en el fenotipo neoplásico (204).

Se ha establecido que el uso por la gestante de ciertas sustancias como marihuana, antihistamínicos, anfetaminas, entre otras, pueden incrementar el riesgo en el hijo de presentar leucemia en la niñez, mientras que el uso sistemático de folato durante el embarazo ha reducido hasta en 60% los casos de neoplasia (207, 208). No se ha podido

establecer el papel de factores medioambientales tales como campos electromagnéticos, exposición a radón, pesticidas y tabaquismo materno en el desarrollo de la enfermedad (202). Otros factores posiblemente implicados incluyen exposición nuclear residencial u ocupacional en los niños o los padres, radiaciones no ionizantes, pesticidas, benceno, vitamina K, aceite de hígado de bacalao, inhibidores de la topoisomerasa II naturales y manufacturados, nitratos de la dieta y el consumo de agua contaminada con tricloroetileno (203). Otra teoría que ha tomado importancia, a raíz de la demostración del potencial oncogénico, son infecciones sobretodo virales (201, 209).

1.6.4 Manifestaciones clínicas de la leucemia linfoblástica B aguda (LLA-B)

La LLA es una enfermedad aguda caracterizada por dolor óseo, síndrome anémico (palidez, taquicardia, astenia, fatiga), trombocitopenia (petequias, hemorragia), neutropenia (infecciones) y organomegalia (hepato-esplenomegalia) ver **Tabla 6**. La mayoría de los pacientes se presentan con falla medular: trombocitopenia, anemia y/o neutropenia. El conteo de leucocitos puede estar disminuido, normal o marcadamente elevado, pero sólo el 50% de los pacientes tienen conteos de blancos mayores de 10000/ μ l. Son frecuentes las linfadenopatías y hepato-esplenomegalia, los dolores óseos y las artralgiás que en conjunto pueden ser síntomas cardinales (202). La Leucemia Linfoblástica de precursores B (LLA-B), es una neoplasia que implica al linaje de células B, compuesto de células blásticas de tamaño pequeño a mediano, con escaso citoplasma, cromatinas dispersas o moderadamente condensadas y nucléolos mínimos. La enfermedad compromete principalmente la médula ósea y la sangre, el compromiso extramedular es algo frecuente con predilección particular por el sistema nervioso central, ganglios linfáticos, bazo, hígado y gónadas (210).

Síntomas constitucionales: astenia, debilidad, pérdida de peso, sudoración nocturna.

Síntomas por infiltración de la médula ósea: anemia por desplazamiento de la serie roja, fiebre e infecciones por desplazamiento de la serie blanca, diátesis hemorrágica (púrpura, epistaxis, gingivorragias) por desplazamiento de la serie plaquetaria (211).

Síntomas por infiltración de algún órgano o tejido: la hepatomegalia, hipertrofia gingival, infiltración de la piel y menos frecuente SNC suele darse en el 5% de las

leucemias linfoblásticas. Puede aparecer dolor óseo espontáneo o a la presión, por infiltración subperióstica, así como adenopatías y esplenomegalia en el 70-80% de los casos (202).

Tabla 6. Síntomas de presentación de LLA.

Síntoma	Frecuencia
Fiebre	57
Fatiga	50
Sangrado	43
Dolor osteoarticular	25
linfadenopatía	70
Hepatomegalia	66
Esplenomegalia	59
Masa mediastinal	8
Compromiso del SNC	3
Compromiso testicular	1

Tomado de: Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL (2005) A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care (Engl)* **14**: 53-62.(203)

1.6.5 Clasificación

Se clasifica según la cooperación Franco Americano Británica (FAB) o según la Organización mundial de la salud (OMS) (212, 213). Durante los años anteriores se empleaba la clasificación FAB, que separaba 3 grupos pronósticos L1, L2 y L3 basados en la morfología celular, donde L2 tenía el peor pronóstico. Esta clasificación fue remplazada por la clasificación de la OMS, que incluye otros parámetros. La clasificación de la FAB y la OMS para las leucemias linfoblásticas se pueden resumir en las [Tabla 7](#) y [Tabla 8](#) respectivamente.

Tabla 7. Clasificación FAB de la LLA.

	L1	L2	L3
Características	Linfoblastos pequeños con cromatina homogénea, escaso citoplasma, sin nucléolos ni vacuolas prominentes	Células grandes y heterogéneas, con núcleo irregular, presencia de nucléolo, citoplasma variable sin vacuolas.	Células grandes y homogéneas, cromatina fina, nucléolos prominentes, con más de 5% de mitosis, citosol basófilo y por lo menos 25% de células vacuoladas.
Frecuencia	80%	17%	3%
Inmunofenotipo asociado	Precursor B o T	Precursor B o T	Células B maduras

Tomado de: Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL (2005) A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care (Engl)* **14**: 53-62.(203)

Tabla 8. Clasificación de la OMS para leucemias de precursores linfoides.

Neoplasias de precursores linfoides	
Leucemia linfoblástica de células B/linfoma no especificado	
Leucemia linfoblástica de células B/linfoma con anomalías genéticas	
•	Leucemia linfoblástica/linfoma con t(9;22)(q34;q11.2); BC-ABL1
•	Leucemia linfoblástica/linfoma con t(v;11q23); reorganización MLL
•	Leucemia linfoblástica/linfoma con t(12;21)(p13;22);TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
•	Leucemia linfoblástica/linfoma con hiperploidía
•	Leucemia linfoblástica/linfoma con hipoploidía (hipodiploidía LLA)
•	Leucemia linfoblástica/linfoma con t(5;14)(q31;q32);IL3-IGH
•	Leucemia linfoblástica/linfoma con t(1;19)(q23;p13.3);E2A-PBX1 (TCF3-PCF3-PBX1)
Leucemia linfoblástica de células T/linfoma	

Tomado de: Swerdlow S, Campo, E., Harris, N. (2009) WHO classification of tumor of hematopoietic and lymphoid tissues. *IARC Press*: 109-138.(213)

1.6.6 Diagnóstico de la leucemia linfoblástica B

El diagnóstico inicial se realiza por la sospecha clínica y se confirma con el análisis morfológico de la medula ósea, si se cumple con: una buena muestra, una buena tinción y suficiente tiempo para revisarla.

A continuación se consideran cuatro apartes diagnósticos (morfología, citoquímica, inmunofenotipo y genética) y un quinto aparte de diagnóstico diferencial.

1.6.6.1 Morfología. Los linfoblastos en frotis y extendidos varían desde blastos pequeños con escaso citoplasma, cromatina nuclear condensada, y nucléolo mínimo, hasta células más grandes con cantidad moderada de citoplasma azul claro-gris azulado, ocasionalmente vacuolado, cromatina nuclear dispersa, y nucléolos prominentes múltiples variables (197). Gránulos azurófilos dispersos están presentes en algunos linfoblastos en aproximadamente 10% de los casos. Estos hallazgos se pueden correlacionar con anormalidades genéticas t(9; 22)(q34; q11.2) (202).

En biopsias de médula ósea, los linfoblastos son relativamente uniformes en apariencia, con núcleos redondos, ovales o indentados y algunas veces enrollados. Los nucléolos variablemente son prominentes, aunque usualmente mínimos o indistintos. La cromatina está finamente dispersa. El número de figuras mitóticas usualmente varía, y son menos numerosas que en su contraparte T (197).

1.6.6.2 Citoquímica. Los linfoblastos son negativos para mieloperoxidasa y carecen de reactividad tipo mielóide con Sudán Negro B (SBB). Los gránulos linfoblásticos pueden teñir gris claro con la tinción SBB pero menos intenso que los mieloblastos. Los linfoblastos pueden mostrar positividad PAS, siendo en algunos casos el núcleo parcialmente rodeado por un anillo de reactividad PAS. Los linfoblastos pueden reaccionar con esterasa inespecífica con punteado multifocal o patrón de aparato de Golgi con inhibición variable con fluoruro de sodio (197).

1.6.6.3 Inmunofenotipo. Los linfoblastos son deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) positivos, HLA-DR positivos, y casi siempre positivos para CD19, CD79a citoplásmica y CD38. Son positivos para CD10 y CD24 en la mayoría de casos; en casos t(4;11)(q21;q23) son usualmente CD10 negativos y frecuentemente CD24 negativos. Hay expresión variable de CD20 y CD22. CD45 puede estar ausente. La expresión citoplásmica de CD22 es considerada específica de linaje. Los antígenos mieloides CD13 y CD33 pueden ser de expresión aberrante (197).

El grado de diferenciación de los linfoblastos del linaje B tiene correlación clínica y genética. En el estado más temprano -precursor temprano-, los blastos expresan CD19, CD79a y CD22 citoplásmicos, y TdT nuclear, y en el estado intermedio -común-, los blastos expresan CD10. Estos dos estados representan la mayoría de casos de leucemia (50-

70%). Entre 20-30% de los casos corresponden con el estado de diferenciación más maduro -preB-, los blastos expresan cadenas mu citoplásmica (cyt- μ). Es característica la ausencia de inmunoglobulina de superficie, pero su presencia no excluye el diagnóstico de LLA-B, puesto que entre el 2-3% de estas neoplasias presentan esta característica y son CD20+ (202).

1.6.6.4 Genética. Las alteraciones genéticas son marcadores pronósticos importantes, detectándose hasta en el 75% de las leucemias linfoblásticas (206). Las alteraciones citogenéticas en neoplasias de precursores B se consideran en varios grupos: hipoploidías, hipodiploidías <50, hiperdiploidías >50, translocaciones y pseudodiploidías (202):

LLA- t(9;22)(q34;q11.2); BCR/ABL

LLA- (v;11q23); re-arreglo MLL

LLA- t(12;21)(p13;q22); TEL/AML1

LLA- t(1;19)(q23;p13.3); PBX/E2A

LLA- hipodiploide

LLA- hiperdiploide >50

Estos hallazgos son de importancia pronóstica y son usados para modificar tratamientos en enfermedad pediátrica (206). Con los tratamientos actuales, los grupos de buen pronóstico son: hiperploidía entre 51 y 65 cromosomas, correspondiente a DI (contenido de DNA) por citometría de flujo de 1.16 a 1.6; y t (12; 21) (p12; q22), la cual es resultado de la fusión del gene TEL en 12p13 con el gen del factor codificante de transcripción AML1 en 21q22. Los hallazgos relacionados con pobre pronóstico son: 1) t (9; 22), la cual resulta de la fusión de BCR en 22q11.2 y el gen de tirosina quinasa citoplásmica ABL en 9q34, y produce una proteína de fusión en niños p190kd BCR/ABL y en la mitad de casos de adultos p210kd y los restantes p190 (predomina en LMC). 2) LLA de precursores B en estados tempranos de diferenciación pueden tener t(4;11) con fusión del gen MLL en 11q23 que codifica una proteína putativa que liga DNA y AF4 en 4q21; otra translocación en 11q23 resulta de la fusión del locus MLL con otras parejas de genes. LLA con anormalidades 11q23 pueden surgir también relacionadas a la terapia de leucemia secundaria a etopósido. 3) t (1; 19), encontrada en el 25% de las LLA-B de niños con expresión citoplásmica de mu, fusiona el gen que codifica el factor de transcripción E2A en 19p13.3 con PBX en 1q23, asociado con pobre pronóstico. 4) La hipodiploidía está asociada con pobre pronóstico. Otras anormalidades del(6q), del(9p), del(12p),

hiperploidías <51, triploidía cercana y tetraploidía cercana) se asocian con pronóstico intermedio(203).

1.6.6.5 Diagnóstico diferencial. Los diagnósticos diferenciales de leucemia linfoblástica B incluyen LLA-T, Leucemia mieloide aguda (LMA) con mínima diferenciación, y médula ósea reactiva con incremento de hematogonias. Las dos primeras son diferenciables por inmunofenotipo. Las hematogonias se pueden incrementar en niños y en adultos mayores con desórdenes tales como anemia ferropénica, neuroblastoma y púrpura trombocitopénica idiopática, o posterior a terapia citotóxica. Estas células tienen una relación núcleo/citoplasma muy alta y una cromatina nuclear homogénea; los núcleos muestran indentación o hendiduras. No se identifican usualmente nucléolos y estas células no se observan en sangre periférica (197).

1.6.7 Estratificación del riesgo y establecimiento del pronóstico

La estratificación de riesgo se basa en características clínicas, inmunológicas y citogenéticas para predecir el desenlace de la enfermedad y brindar una terapia óptima. Para tal fin se han definido tres estratos de riesgo: estándar, medio y alto, denominados por algunos como bajo, estándar y alto, aunque la mayoría de centros sólo emplea los dos últimos. En general, los de bajo riesgo tienen mejor desenlace, requieren terapia menos intensiva y tienen menos probabilidad de recurrencia (203).

Las Leucemias Linfoblásticas B son generalmente leucemias de buen pronóstico. En el grupo pediátrico la tasa de remisión completa es del 95%, y en adultos entre 60-85%. La tasa de supervivencia libre de eventos es del 70% en niños; aproximadamente, el 80% de los niños aparentan curación (206). Los grupos de riesgos pediátricos de LLA-B se basan en perfiles citogenéticos, edad, conteo de leucocitos, sexo y respuesta a la terapia inicial. En edad pediátrica, más del 50% de los pacientes tienen buen pronóstico relacionado con cariotipos de hiperploidías o cambios genéticos t (12; 21) con supervivencia a largo plazo del 85-90%. Las características genéticas son importantes pero resultan heterogéneas si se tienen en cuenta otros factores (203). Factores predictivos para remisión durable y supervivencia prolongada son edad entre 4 y 10 años, hiperploidías (54-62 cromosomas) con trisomías 4, 10 y/o 17, t (12; 21) (p13; q22) y conteo normal o bajo de leucocitos al diagnóstico. Los factores adversos incluyen edad <1 año, t(9;22)(q34;q11.2) y

t(4;11)(q21;q23) (197). Las hipoploidías presentan relación directamente proporcional con el pronóstico: a menor número de cromosomas, menor supervivencia (206).

1.6.8 Tratamiento

El tratamiento inmediato de la LLA requiere manejo efectivo de los efectos colaterales de la enfermedad, destrucción de las células tumorales, y manejo apropiado de los efectos adversos del tratamiento. Establecido el grupo de riesgo al que pertenece el paciente se diseña la terapia. En el grupo de bajo riesgo (40%) se emplean antimetabolitos estándar. Mientras que en pacientes de riesgo estándar (51%) y alto riesgo (9%), el tratamiento es más intenso evitando la aparición de resistencias. Los pacientes de más alto riesgo son candidatos a trasplante de células madre luego de la primera remisión (203). Determinado el riesgo, se establece el tratamiento buscando inducir la remisión, prevenir la infiltración leucémica al sistema nervioso central, y ofrecer terapia de mantenimiento prolongada (2 a 3 años). Un resumen de los fármacos empleados en el tratamiento de leucemia junto con sus efectos adversos se presenta en la [Tabla 9](#). Por último, es válido anotar que las recurrencias se correlacionan con dosis inadecuadas más que a resistencia tumoral, por lo que la individualización de la terapia ha generado mejores resultados. Sin embargo, la resistencia es un problema en ciertos casos. La resistencia *de novo* puede ser analizada *in vitro* por ensayo de citotoxicidad con metil-tiozol-tetrazolio (MTT), *in vivo* por el tiempo a la depuración de blastos, y la medición de EMR determina la emergencia de nuevas resistencias (201).

Tabla 9. Medicamentos empleados en la terapéutica de la LLA.

Tratamiento	Tipo	Efectos adversos
Prednisona Dexametasona	Glucocorticoides sintéticos	Hiperglicemia, hipertensión, cambios del ánimo, acné, ganancia de peso, hepatomegalia, necrosis avascular del hueso, osteoporosis
Metotrexate	Análogo del Folato, antimetabolito	Náusea/vómito (NV), disfunción hepática, mielosupresión, fotosensibilidad, leucoencefalopatía, osteoporosis. Administración intratecal: cefalea, fiebre, convulsiones
Vincristina	Alcaloide	Neuropatía periférica, constipación, convulsiones, pérdida de peso, celulitis química
Doxorrubicina Daunorrubicina	Antraciclina	NV, pérdida de peso, mucositis, mielosupresión, celulitis química, cardiomiopatía
L-asparaginasa	Enzima	NV, reacciones alérgicas, hiperglicemia, pancreatitis, disfunción hepática, trombosis y encefalopatía
6-mercaptopurina	Análogo de purinas	NV, mucositis, mielosupresión, fotosensibilidad, disfunción hepática, osteoporosis
Etoposido	Epipodofilotoxina	NV, pérdida de peso, mucositis, mielosupresión, reacciones alérgicas, LMA
Citarabina	Antimetabolito	NV, fiebre, rash, mucositis, mielosupresión, disfunción hepática, conjuntivitis, infertilidad
Ciclofosfamida	Agente Alquilante	NV, cistitis hemorrágica, mielosupresión, SIADH, pérdida de peso, cáncer de vejiga, LMA, infertilidad
Radiación SNC	Radiación	Pérdida de peso, somnolencia postratamiento, convulsiones, disfunción neurológica y endocrina, pérdida de peso, osteoporosis, tumores cerebrales

Tomado de: Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL (2005) A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care (Engl)* 14: 53-62(203)

1.7 Línea celular Reh

La línea celular Reh (ATCC® CRL-8286™) proviene de células obtenidas en 1973 de una paciente de 15 años de edad con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA de primera recaída). Son células redondas, pequeñas con morfología linfoblástica que crecen en suspensión. Tiene el siguiente perfil de expresión de marcadores CD3 (-), CD10 (+), CD13 (-), CD19 (+), CD34 (-), CD37 (-), CD38 (+), cyCD79a (+), CD80 (-), CD138 (+), HLA-DR (+), ms/cyIgG (-), sm/cyIgM (-), sm/cykappa (-), sm/cylambda (-). El cariotipo es humano pseudo diploide - 46 (44-47) <2n> X,-X, 16, del (3) (p22), t (4; 12; 21; 16) (q32; p13; q22; q24.3) -inv (12) (p13q22), t (5; 12) (q31-q32; p12), der (16) t (16; 21) (q24.3; q22) - línea lateral con inv (5) der (5) (p15q31), es positiva para la translocación t (12; 21) que lleva el gen de fusión ETV6-RUNX1. El análisis viral de esta línea celular reporta que es EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -. El nivel de bioseguridad de manejo es 1 y el tiempo de doblaje poblacional es de alrededor de 50 a 70 horas. Inicialmente después de la descongelación las células pueden ser difíciles de cultivar y deben ser mantenidas con una densidad alta (> 2 x 10⁶ células/ml); estas células crecen lentamente y la densidad mínima a cultivo debe ser de 0,5 x 10⁶ células/ml; se recomienda que las células sean cultivadas inmediatamente luego de la descongelación en medio RPMI con 20% de suero fetal bovino (FBS) en una placa de 24 pozos; después de la descongelación la viabilidad generalmente disminuye durante los primeros días, pero las células se recuperan después. Se recomienda no cambiar el medio de cultivo durante este tiempo.

<http://www.atcc.org/products/all/CRL8286.aspx?7301B7F956944F8382B6192957C08A3>

(fecha de consulta 30 de Julio de 2018).

2. Capítulo 2. Marco contextual

2.1 Antecedentes

Dentro de los diversos objetos de estudio de la biología celular, el uso de virus oncolíticos como tratamiento contra el cáncer no es novedad. Sin embargo, fue en años recientes que la investigación en este campo ha demostrado avances significativos. Los primeros estudios, realizados en cáncer de cuello uterino, fueron documentados por Dock(214) en 1904 y DePace(215) en 1912, quienes concibieron la idea de que el potencial que tienen los virus para lisar células podría ser usado para destruir las neoplásicas. En estos reportes se informó sobre regresiones tumorales generadas como un evento posterior a las respuestas incompletas o transitorias generadas por la infección con los virus de la influenza y de la rabia, respectivamente. De igual modo, desde mediados de la década de 1960 se han reportado casos de este tipo, asociados a infecciones virales, como la viruela, herpes zoster, hepatitis o sarampión (41, 43, 55). El avance en el desarrollo de la biología molecular y la bioquímica tumoral, ha permitido la reanudación de estas labores investigativas, permitiendo modificar algunos virus para darles mayor capacidad de infección y destrucción selectiva de células tumorales. En la actualidad, los virus oncolíticos se estudian en modelos *in vitro* e *in vivo* en ratones y humanos (55). (Ver [Tabla 2](#)).

Trabajos previos realizados en el Laboratorio de Biología molecular de Virus de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional de Colombia, han reportado algunas moléculas asociadas tanto *in vivo* como *in vitro* en el proceso de infección por el rotavirus tales como las proteínas integrina $\alpha V\beta 3$, PDI y Hsc70 (22, 28, 29, 92, 216). Estos resultados han sido corroborados por otros investigadores en el mundo(25, 193). Igualmente, diferentes autores han encontrado que estas proteínas son marcadores de progresión tumoral en el cáncer de mama, retinopatía asociada a cáncer, el glioma invasivo, eritroleucemia, el cáncer colon-rectal y el carcinoma de células escamosas (166, 184, 196, 217, 218). Adicionalmente, en nuestro laboratorio, durante 3 años se seleccionaron en líneas celulares tumorales, 5 aislamientos rotavirales, incluyendo el rotavirus que se utilizará en este trabajo el WT1-5, capaces de utilizar diferentes HSPs durante el proceso infeccioso.

Siguiendo las recomendaciones del "The international conference on harmonisation of technical requirement for registration of pharmaceuticals for human use" (ICH) respecto al diseño y uso de agentes virales oncolíticos es necesario en primer lugar desarrollar estudios en modelos *in vitro* que determinen las características replicativas diferenciales del virus en tejido neoplásico (70). Este requerimiento general se ha evaluado en trabajos previos realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, en diferentes líneas tumorales como la línea celular de leucemia mieloide humana U937, leucemia linfoblástica aguda Reh, mieloide de ratón Sp2/0-Ag14, cáncer de estómago Kato III, cáncer de pulmón A549, cáncer de mama MDA-MB-231, cáncer de próstata PC-3; como control se utilizaron células normales no tumorales. En general los resultados fueron similares para todas las líneas tumorales examinadas, con pequeños cambios. Se determinó que 5 aislamientos rotavirales seleccionados previamente en este mismo laboratorio (WWM, WTEW, TRUYO, ECWt-O y Wt1-5, no reportados aun en artículos), infectan líneas tumorales con mayor eficiencia, respecto a los mismos rotavirus parentales (Wa, Wi, 69M, TRF, RRV, UK, YM, ECwt, Wt1, Wt2, Wt3, Wt4 y Wt5). Se determinó así mismo el título viral para cada uno de los aislamientos rotavirales, evaluando la producción de viriones y la capacidad de lisar las células tumorales analizadas. Se encontró que la infección ocurre tempranamente desde las 4 h.p.i. e incluso con multiplicidad de infecciones bajas (MOI) de 0.5, ocurre lisis celular a las 24 horas en la mayoría de la población celular. Estos resultados sugieren que la cantidad de viriones infecciosos se incrementa sobre el curso de la infección y es oncolítico. Se evaluó el efecto citotóxico producido por los rotavirus mediante las técnicas de yoduro de propidio, Hoechst, Anexina V, azul tripán, ADP-ribosa, fosfatidilserina y TUNEL. En estos trabajos se determinó la expresión de las proteínas HSPs (Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60, Hsp40), integrina $\alpha\beta3$ y PDI en la superficie de la membrana citoplasmática de las células por medio de citometría de flujo, inmunofluorescencia o confocal (219-221). Se determinó que los 5 aislamientos rotavirales seleccionados, examinados en las líneas celulares mencionadas, utilizan las proteínas de choque térmico durante el proceso infeccioso, puesto que al incubar las células con anticuerpos anti-HSPs, Anti-PDI y anti-integrina $\beta3$ y luego retarlas con los rotavirus, se observó disminución del porcentaje de células positivas para antígenos virales, en diferente grado para cada anticuerpo y para cada aislado rotaviral, sugiriendo que estos rotavirus utilizan diferencialmente estas proteínas de la membrana durante el proceso infeccioso (221). Igualmente se encontró interacción de los rotavirus con las HSPs de las membranas citoplasmáticas de las líneas

celulares tumorales al incubar el rotavirus con las células integra, con fracciones de membrana citoplasmática o con fracciones proteicas enriquecidas con Hsp 90, 70 o 60. En estos trabajos se encontró que dicha unión disminuye si las membranas citoplasmáticas se pre-incuban con anticuerpos anti-HSPs. Igualmente la unión del rotavirus a las membranas disminuye si el virus se pre-incuba con proteínas HSPs o con péptidos específicos de las HSPs, sugiriendo que la unión es específica. También se encontraron cambios en la infección por rotavirus tras inhibir las HSPs, utilizando reactivos reportados como inhibidores de las mismas (220).

Los aislados de rotavirus no infectaron células normales (no tumorales), como las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas o la línea celular de fibroblastos de ratón, L929. Sin embargo, estas células se infectaron con éxito después de someterlas a choque térmico (221). En conclusión, los aislados de rotavirus infectan y lisan las líneas celulares tumorales examinadas, ingresan utilizando diferencialmente las HSPs (Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60 o Hsp40), PDI y la integrina $\alpha\beta 3$ de membrana citoplasmática, sugiriendo que han adquirido ganancia de función para utilizar proteínas de choque térmico (HSPs), con excepción de Hsc70 que ya había sido reportada, como moléculas implicadas en el proceso infeccioso de los tumores estudiados. Puesto que las HSPs se encuentran como marcadores de progresión tumoral en la mayoría de tumores, nuestros hallazgos sugieren que estos aislados virales pueden ser potenciales virus oncolíticos, resultado que es novedoso porque en la literatura no se encuentran antecedentes del uso del rotavirus como virus oncolítico.

2.2 Formulación del problema

En estudios previos realizados en el Laboratorio de Biología molecular de Virus de la Facultad de Medicina, se encontró que el rotavirus Wt1-5 adaptado infecta y lisa las líneas celulares tumorales de linfoma histiocítico 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.(219-221) Los hallazgos encontrados para el aislamiento Wt1-5 en las líneas evaluadas, muestran que este rotavirus emplea diferencialmente las HSPs (Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60 o Hsp40), PDI y la integrina $\alpha\beta 3$ de membrana citoplasmática durante el proceso infeccioso. Por otro lado, las HSPs han sido reportadas como marcadores de progresión tumoral en algunas neoplasias, en especial en tumores

sólidos. Sin embargo, no se ha determinado la expresión de estas proteínas en cultivos primarios de células tumorales de pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda, ni se ha evaluado si rotavirus Wt1-5 adaptado infecta y lisa este tipo de células neoplásicas o la línea leucemia linfoblástica aguda Reh, disminuyendo la viabilidad celular.

2.3 Justificación

Siguiendo las recomendaciones del ICH respecto al diseño y uso de agentes virales oncolíticos es necesario en primer lugar desarrollar estudios en modelos *in vitro* que determinen las características replicativas diferenciales del virus en el tejido neoplásico(70). Por esta razón, es necesario determinar en cultivos primarios de células de leucemia linfoblástica de precursores B provenientes de pacientes con diagnóstico de leucemia en fase aguda, si son susceptibles a la infección y al efecto oncolítico del rotavirus Wt1-5 adaptado, previamente examinado en el Laboratorio de Biología molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia. Lo anterior resulta importante porque las células tumorales procedentes directamente del paciente pueden comportarse de manera diferente a las líneas tumorales de referencia. Adicionalmente, hay heterogeneidad en la población celular del paciente (células normales, moderadamente diferenciadas e indiferenciadas), mientras que las líneas establecidas son más o menos homogéneas. En este sentido, este trabajo implica investigación básica que nos aportará más evidencias, que en un futuro nos permitirán proponer a este aislamiento como un virus oncolítico, es decir, si el rotavirus Wt1-5 puede utilizarse como un producto biotecnológico en la lucha contra el cáncer. Adicionalmente, se busca que este conocimiento nos permita a futuro desarrollar un modelo murino que posibilite estudiar la seguridad clínica al administrar el rotavirus intratumoralmente.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

- Establecer los efectos que tiene la infección por el rotavirus adaptado oncolítico Wt1-5 sobre las señales celulares relacionadas con muerte y estrés celular en cultivos primarios de células de leucemia linfoblástica aguda de precursores B.

2.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad infecciosa del rotavirus adaptado oncolítico Wt1-5 en cultivos primarios de células de leucemia linfoblástica aguda de precursores B.
2. Evaluar las señales de citotoxicidad relacionadas con muerte celular en cultivos primarios de células de leucemia linfoblástica aguda de precursores B inoculadas con el rotavirus adaptado oncolítico Wt1-5.
3. 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
4. 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 durante el proceso infeccioso del rotavirus Wt1-5 adaptado en células de cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores de B.
5. Caracterizar el electroferotipo y genotipo del rotavirus adaptado oncolítico Wt1-5.

3. Capítulo 3. Materiales y métodos

En este capítulo se incluye todos los parámetros técnicos y metodológicos tenidos en cuenta para el diseño y ejecución de este trabajo. Es importante mencionar con antelación que los ensayos con el rotavirus Wt1-5 adaptado no tuvieron ninguna injerencia sobre los pacientes, ni sobre los médicos que atendieron a los pacientes.

3.1 Diseño

El presente estudio se desarrolló sobre muestras de sangre periférica provenientes de pacientes en edad pediátrica, manejados en la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI). La toma de la muestra necesaria para la ejecución del proyecto se efectuó simultáneamente con la toma de las demás muestras realizadas durante la atención del paciente con el propósito de no efectuar venopunciones adicionales. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y el comité de ética de la Institución Hospitalaria, y contó con la autorización registrada bajo la firma de un consentimiento informado por los padres o tutores del paciente ([Anexo 4](#)) y mediante la firma de un asentimiento informado en los casos que lo ameritaron ([Anexo 5](#)).

3.1.1 Universo

Pacientes en edad pediátrica (entre 0-18 años) atendidos en la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI) con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

3.1.2 Muestra

Se colectaron muestras de sangre periférica de 34 pacientes en edad pediátrica (0-18 años) que fueron atendidos en la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI) durante el un periodo de tiempo de dos años, con diagnóstico inmunofenotípico de leucemia linfoblástica aguda de precursores B confirmado en aspirados de medula ósea (AMO).

3.1.3 Selección de casos

Se identificaron los pacientes con diagnóstico inmunofenotípico de leucemia linfoblástica aguda de precursores B, en la base de datos del servicio de oncohematología pediátrica de la Fundación Hospital de la Misericordia (HOMI).

3.1.3.1 Criterios de inclusión

- Pacientes de sexo masculino o femenino en edad pediátrica (0-18 años) con diagnóstico inicial de leucemia linfoblástica aguda de precursores B.
- Pacientes con diagnóstico inicial de leucemia linfoblástica aguda de precursores B, que no hayan iniciado tratamiento.
- Pacientes de riesgo bajo, intermedio (estándar) y alto al momento del diagnóstico.
- Pacientes con recuentos de leucocitos en sangre periférica $> 5000 \text{ cel/mm}^3$.
- Pacientes con presencia de $> 20\%$ de blastos en sangre periférica.
- Pacientes con autorización para toma de muestra mediante consentimiento informado firmado por los padres o tutores.
- Pacientes con autorización para la toma de muestra mediante asentimiento informado en los casos que este fue requerido.

3.1.3.2 Criterios de exclusión

- Pacientes con diagnóstico de linfoma.
- Pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de precursores T.
- Pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide aguda.

Nota: Los anteriores criterios de exclusión fueron tenidos en cuenta debido a que se pretendió evaluar el comportamiento oncolítico del rotavirus Wt1-5 sobre un linaje celular específico.

- Pacientes con sepsis.
- Pacientes con trastornos de la coagulación.

Tabla 10. Lista de Variables evaluadas.

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPO	DESCRIPCIÓN	FUENTE	CÓDIGO
Género (*)	Características que clasifican al individuo como hombre o mujer	Cualitativa Nominal	%	HC	1. Hombre 2. Mujer
Edad (*)	Años cumplidos al momento del diagnóstico	Cuantitativa discreta	años	HC	
Riesgo (*)	Tipo de riesgo asignado para el tratamiento	Cualitativa nominal		HC	1. Bajo 2. Intermedio 3. Alto
Leucocitos (*)	Número de leucocitos al diagnóstico	Cuantitativa Continua	Células/mm ³	HC	
Inmunofenotipo (*)	Tipo de inmunofenotipo al diagnóstico	Cualitativa Nominal			1. Pro B 2. Pre B 3. B común 4. Mixta
Blastos (*)	Porcentaje de blastos en sangre periférica al diagnóstico	Cuantitativa Continua	%	HC	
Cariotipo MO (*)	Análisis de cariotipo al diagnóstico	Cualitativa Nominal		HC	
Porcentaje de infección	Porcentaje de células de cultivo primario positivas para antígenos rotavirales	Cuantitativa Continua	%		
Muerte celular	Mecanismo de muerte celular generado durante la inoculación con rotavirus	Cualitativa Nominal			1. Apoptosis 2. Necrosis
		- Cuantitativa Continua	%		
Expresión de HSPs	Intensidad y porcentaje de expresión de las HSPs (90, 70,60,40) y Hsc70 en la membrana citoplasmática de las células de cultivos primarios	Cuantitativa Continua	%		
			Intensidad media de fluorescencia		
Uso de las HSPs	Unión de antígenos rotavirales a las proteínas HSPs (90, 70,60,40) y Hsc70	Cuantitativa Continua	%		
			Índice de colocalización		

Nota: Las variables con asterisco (*) son parámetros que se evalúan de forma rutinaria dentro del protocolo de manejo establecido por el Hospital de la misericordia para los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

3.1.4 Línea celular

La línea celular humana de leucemia linfoblástica aguda Reh (ATCC® CRL-8286™) fue gentilmente donada por el Dr. J. P. Vernot (Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia). Se cultivó en frascos T-25 (Corning) con medio RPMI 1640 (Sigma-

Aldrich®) suplementadas con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (Gibco®) más 20 U/ml de Penicilina con 40 U/ml de estreptomycin (Invitrogen®), incubada en atmosfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. El cultivo fue mantenido por adición o reemplazo de medio de cultivo fresco cada 2 a 3 días.

3.1.5 Stock de rotavirus

El rotavirus Wt1-5 proviene de la adaptación al crecimiento en cultivo en células tumorales de cinco aislamientos rotavirales (Wt1, Wt2, Wt3, Wt4, Wt5) purificados previamente de materia fecal de niños con diarrea confirmada por rotavirus (37, 222, 223). Se cultivó y purificó el rotavirus en células Reh mediante gradiente de densidad discontinuo de cloruro de cesio (CsCl) (densidades 1.4157, 1.3039, 1.2070 y sacarosa al 30%) (224). Las partículas virales purificadas fueron almacenadas en alícuotas de Buffer TMS. El virus se activó mediante tratamiento con tripsina (1 µg/ml) (Chimie Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, Francia) a 37°C durante 20 minutos.

Nota: El "Stock" viral contenía un título aproximado de 2.5×10^5 UFF/ml, determinado previamente mediante la realización de un ensayo de dilución máxima del aislamiento viral en la línea celular Reh.

3.1.6 Titulación de rotavirus

El título viral y la estabilidad del rotavirus Wt1-5 fueron medidas analizando las unidades formadoras de foco mediante ensayo de dilución seriada del stock en la línea celular Reh. Platos de 48 pozos fueron sembrados con 2×10^5 células Reh por pozo con medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) sin suplemento de FBS e infectadas con diluciones seriadas del Stock viral. Después de 1 hora de incubación a 37°C, la solución viral fue removida y las células fueron mantenidas por 11 horas adicionales adicionando medio de cultivo fresco. 12 horas post infección (h.p.i) las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (v/v) en buffer fosfato salino (PBS). Mediante inmunocitoquímica se determinó la expresión de antígenos virales y se realizó el conteo de las unidades formadoras de foco (224).

3.1.7 Inactivación del rotavirus por irradiación UV

El Rotavirus Wt1-5 fue inactivado mediante exposición a 720 milijoules de irradiación UV usando una lámpara de luz UV (Hoefler UVC 500. Ultraviolet Crosslinker) para entrecruzar

el RNA, sometiendo alícuotas de 50µl de un stock vital de $1,2 \times 10^{10}$ ufp/ml. Los ensayos de viabilidad celular y activación de señales de muerte celular fueron desarrollados como se describió anteriormente usando el virus inactivado en la línea Reh para comparar el efecto de la replicación viral sobre la viabilidad celular. Este tratamiento entrecruza irreversiblemente el RNA viral, pero no altera la función de hemaglutinación ni las características antigénicas de la proteína del rotavirus (225).

3.1.8 Análisis del dsRNA rotaviral

Para determinar el electroferotipo del rotavirus se tomaron alícuotas (50µl) de los stocks de virus Wt1, Wt2 y Wt1-5 previamente purificados en gradiente de densidad con CsCl. Se adicionó Buffer de lisis (260 mM de Tris-HCl pH 8, 90 mM EDTA, 1.3 % de SDS, 680 mM de NaCl y 0,1% de 2-ME). Se extrajo el dsRNA con Fenol-Cloroformo (1:1). Se precipitó la fase acuosa con 2 volúmenes de etanol absoluto a -70 °C. Se resuspendió el dsRNA rotaviral en Buffer de carga (62 mM de Tris pH 6.8, 2% (w/v) de SDS, 0.001% (w/v) de azul de bromofenol y 10% (v/v) de glicerol). El electroferotipo del dsRNA extraído se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE (8%) usando el sistema de Buffer Laemmli y el desarrollo del gel con tinción de plata (226, 227).

3.1.9 Infección de las células

Las células Reh fueron centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos, se descartó el medio de cultivo y se le realizaron dos lavados con medio RPMI para retirar el suero fetal bovino o el suero, inmediatamente se les adicionó medio de cultivo RPMI sin FBS, se sembraron 2.0×10^5 células por pozo en un volumen 300 µl, en cajas de 48 pozos y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Las células Reh fueron retadas con varias multiplicidades de infección (MOI) desde 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 y 6 del rotavirus Wt1-5 adaptado previamente activado con 1 µg/ml tripsina a 37 °C durante 30 minutos. El virus se adicionó a las células en ausencia de FBS. Como controles se establecieron células a las cuales no se les inoculó rotavirus y células a las que se les inoculó con el aislamiento Wt1-5 previamente inactivado con luz UV con las mismas MOI. Las células se cosecharon a las 24 h.p.i., se fijaron con paraformaldehído al 4% (vol/vol) en buffer fosfato salino (PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados con PBS; las células se resuspendieron

en PBS con 0,02% (peso/vol) de azida de sodio almacenándolas a 4°C hasta su procesamiento (No mayor a 10 días).

3.1.10 Ensayo de re-Infeción de la línea tumoral Reh para determinación del ciclo infeccioso

Para determinar el periodo de tiempo que se tarda el rotavirus Wt1-5 adaptado en cumplir un ciclo viral en las células Reh (etapas de fijación, penetración, desenvolvimiento, síntesis, ensamble y liberación), las células REH fueron inoculadas con rotavirus como se describe previamente con MOI de 1 y 2 y se colectaron alícuotas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 y 48 h.p.i. Dichas células se congelaron-descongelaron dos veces, se sometieron a centrifugación a 700 g, al sobrenadante se le adicionó tripsina (1 µg/ml) durante 30 minutos. Seguidamente, el lisado se inoculó de nuevo en la línea celular Reh. Luego de 12 h.p.i., las células fueron analizadas para determinar la producción de títulos infecciosos mediante la determinación de las proteínas estructurales de rotavirus empleando anticuerpos de conejo mediante ensayos de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.

3.1.11 Inmunocitoquímica para evaluación de la expresión de antígenos rotavirales en las células Reh

Para este ensayo las células Reh fueron dispensadas sobre láminas cubreobjetos, se permeabilizaron con triton X-100 al 0.1% (vol/vol) por 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados adicionando PBS durante 5 minutos. Se adicionó suero hiper inmune contra proteínas estructurales del rotavirus (1:2000 vol/vol) generado en conejo en nuestro laboratorio, al cual previamente se le descartó reacción cruzada para antígenos celulares. El anticuerpo se incubó 1 h a 37 °C, se realizaron dos lavados con PBS, se adicionó el anticuerpo secundario burro-anti-conejo IgG-conjugado con peroxidasa (HRP, 0.13 µg/ml, Santa cruz Biotechnology®) y se incubó 1 h a 37 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS y se reveló el ensayo utilizando 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%. Para la evaluación de los antígenos virales se tomaron diez fotografías representativas de cada laminilla en un microscopio de luz convencional (VanGuard) con el objetivo de 40 X. El porcentaje de células positivas para antígenos rotavirales fue determinado en el total de la población contando al menos 1000 células por tratamiento, determinando así el número de células positivas y negativas en

cada laminilla; el número de células positivas se dividió por el total de células (infectadas más no infectadas). Para el conteo se utilizó el programa ImageJ 1.44 [Java 1.6.0_20](#) de 32-bit.

3.1.12 Citometría de flujo para evaluación de la expresión de antígenos rotavirales en las células Reh

Las células Reh fueron inoculadas con el rotavirus Wt1-5 adaptado como se describió anteriormente, con MOI de 1 y 2. Las células se fijaron luego de 24 h.p.i. con paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos, se lavaron dos veces con PBS, se permeabilizaron con triton X-100 al 0.5% (vol/vol) por 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados con PBS. Para disminuir la auto fluorescencia celular, se adicionó 50mM de cloruro de amonio (NH_4Cl_2) y 0,1 M de Glicina en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS y se adicionó el suero hiper inmune contra proteínas estructurales del rotavirus 1:2000 vol/vol diluidos en PBS + BSA al 1% durante 1 h a 37 °C, se efectuaron dos lavados con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario conjugado FITC (0.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Santa Cruz SC-2024) diluidos en PBS + BSA al 1% durante 30 minutos a 37 °C protegidos de la luz. Se detectó la fluorescencia en el Citómetro de flujo FACS canto II. Para el análisis de los datos se emplearon los programas FlowJo vX.0.7 o FACS Diva software (Becton Dickinson. BD). Anticuerpos de control de isotipo se usaron como control negativo para ajustar los cuadrantes. Se determinaron los datos de intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada una de las variables y su control sin marcación.

3.1.13 ELISA de captura para evaluación de presencia de antígenos rotavirales en el sobrenadante del cultivo

Se determinó la presencia de antígenos rotavirales en el sobrenadante de las células Reh inoculadas o no con el aislamiento Wt1-5 como se describió anteriormente, con MOI desde 0.01 hasta 6. Para esto, el sobrenadante se analizó mediante un ensayo de ELISA en sándwich tipo HADAS (Heterologous Double antibody Sandwich), en microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano, fijando los anticuerpos del suero hiperinmune anti rotavirus (anti-proteínas estructurales) generados en cobayo (dilución 1:1000 en PBS+ BSA al 1%) al soporte insoluble durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con buffer de lavado (PBS+Tween 20 al 0.05%) para eliminar los anticuerpos no

fijados, se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS, se lavó la placa 2 veces con buffer de lavado e inmediatamente se adicionaron por triplicado 100 μ l de sobrenadante. Como control se aplicó el sobrenadante de células inoculadas con el rotavirus adaptado previamente inactivado con luz UV (MOI de 2) y de los pozos donde no se adicionó ningún virus. Los sobrenadantes se incubaron en la placa toda la noche a 4 °C, luego se lavó tres veces con buffer de lavado, se adicionaron anticuerpos de suero hiperinmune anti rotavirus hecho en conejo (dilución 1:2000 en PBS+ BSA al 1%) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, la placa se lavó 2 veces y se incubó con los anticuerpos IgG anti conejo hechos en cabra conjugados con HRP (0.13 μ g/ml en PBS + BSA al 1%, Santa cruz Biotechnology®) durante 1 hora a 37 °C. Luego, se lavó la placa dos veces y se reveló el ensayo utilizando H₂O₂ y OPD (o-phenyldiamine dihydrochloride). (Ref: 34062. Thermo Scientific), dejando incubar la reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂SO₄ al 2N y se realizó la lectura de la placa a 490 nm en el lector de microplacas Ultramark microplate reader. Modelo 8422 (Biorad). Los datos se analizaron con ayuda del programa *Gen5 data analysis software* (Biotek). La absorbancia obtenida en los controles se restó a los tratamientos y se graficó como Δ OD.

3.1.14 Viabilidad celular con azul de tripan

Las células Reh fueron inoculadas con el rotavirus Wt1-5 adaptado como se describió anteriormente con MOI desde 0.05 hasta 6. Se valoró la permeabilidad de la membrana citoplasmática mediante el método de exclusión con azul de Tripano. Para esto a las células se les adicionó azul de Tripano al 0.4 % (vol/vol) durante un minuto en relación 1:1, se examinó la muestra de inmediato en la cámara de Neubauer, en el microscopio invertido con el objetivo 40 X (Euromex). Como controles se establecieron células a las cuales no se les inoculó rotavirus y células tratadas con 1 mM de H₂O₂. Se realizó el conteo del número de células viables y del número total de células.

3.1.15 Ensayos de proliferación celular con Cell Tracker

Se colectaron las células y fueron centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos, se descartó el medio de cultivo y se lavaron dos veces con medio RPMI para retirar el suero fetal bovino. Se resuspendieron suavemente 1.0 x 10⁶ células/ml en la solución de trabajo de CellTracker™ Blue CMAC Dye (Life Technologies) preparada en medio de cultivo RPMI

sin suplemento de FBS a una concentración de trabajo de 0.5 μ M a 37 °C. (Concentración del Stock a 1mM preparado en DMSO a 10%). Las células se incubaron durante 30 minutos con el reactivo CellTracker™ Blue CMAC Dye a 37 °C con 5% de CO₂, luego se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos para remover el reactivo. A continuación se sembraron 2.0 x 10⁵ células por pozo en un volumen 300 μ l de medio de cultivo RPMI sin FBS en cajas de 48 pozos y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Las células fueron infectadas con Wt1-5, MOI de 1, 2, 3 y 6 previamente activado con 1 μ g/ml tripsina a 37 °C durante 30 minutos. Se realizó la medición de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) a las 0h, 24 y 48 h.p.i. en el lector de fluorescencia de microplacas FLx800 (Biotek) empleando el filtro de excitación de 370 nm y el filtro de emisión de 470 nm. Se tomaron cinco fotografías representativas de cada tratamiento en un microscopio de fluorescencia (VanGuard) con el objetivo de 60 X. Como controles se establecieron células a las cuales no se les inoculo rotavirus, células tratadas con 1 mM de H₂O₂ y células a las que se les inoculo con el aislamiento Wt1-5 previamente inactivado con luz UV con un MOI de 2 durante los mismos tiempos del ensayo.

3.1.16 Evaluación de lisis celular con LDH

Se evaluó la actividad de la deshidrogenasa láctica (LDH) en el sobrenadante del cultivo. Para este ensayo las células Reh fueron inoculadas con el rotavirus Wt1-5 adaptado como se describió anteriormente con MOI de 1, 2, 3, 6 sin suplemento de FBS. Se recuperaron los sobrenadantes del cultivo a las 0, 24, 32 y 48 h.p.i. y Los sobrenadantes se procesaron inmediatamente fueron obtenidos. Se empleó el kit de análisis de LDH de BioSystem según las instrucciones del fabricante. El reactivo contiene: Reactivo A: Tris 100 mmol/L, piruvato 2,75 mmol/L, cloruro de sodio 222 mmol/L, pH 7,2. Reactivo B: NADH 1,55 mmol/L, sodio azida 9,5 g/L (LDH BioSystem Cod. 12580). Las muestras se analizaron a 340 nm en el espectrofotómetro GENESYS™ 20 (Thermo Spectronic) en cubetas termostatzables de 1,0 cm de paso de luz a 37 °C. Como controles se establecieron células a las cuales no se les inoculo rotavirus, células tratadas con 1 mM de H₂O₂ y células a las que se les puso el aislamiento Wt1-5 previamente inactivado con luz UV, con un MOI de 2.

3.1.17 Evaluación del efecto citotóxico a nivel metabólico con Resazurina

Las células Reh fueron infectadas con MOI desde 0.05 hasta 6 en ausencia de FBS. Luego de 12 y 24 h.p.i., se removió el medio de cultivo mediante centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos y se realizaron dos lavados con PBS (pH 7,3). A continuación se sembraron 6.6×10^4 células por pozo, en placas de 96 pozos en un volumen 100 μ l de medio de cultivo RPMI, sin FBS, con Resazurina (Amresco® Code 0695-25G) al 0.4 μ M y se incubó durante 4 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Posteriormente, las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación 535 nm y 595 nm de emisión en el lector de placas Cytation 3 Cell Imaging Multimode Reader (Bio-Tek). Como controles se establecieron células a las cuales no se les inoculo rotavirus, células tratadas con 1 mM de H₂O₂ y células inoculadas con el aislamiento Wt1-5 previamente inactivado con luz UV con un MOI de 2 durante los mismos tiempos del ensayo.

3.1.18 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial (delta ψ m) con DiOC6(3) y de la permeabilidad de membrana citoplasmática con 7-AAD

Las células Reh fueron inoculadas en ausencia de FBS como se describió anteriormente, con el rotavirus Wt1-5 con MOI de 2. Transcurridas 24 h.p.i., 1×10^6 células/ml fueron incubadas con 20 nM de DiOC6(3) (3,3'-Dihexyloxacarboyanine Iodide, Life Technologies, Cat: D-273) y simultáneamente con 2 μ g/ml (1.6 μ M) de 7-AAD (7-Aminoactinomycin D, Life Technologies, Cat: A1310) en buffer PBS (pH7,3) + 0.3 mM Ca²⁺ + 0.3 mM Mg²⁺ + 0,2% de BSA + 0,1 % de azida de sodio durante 15 minutos a 37°C protegidas de la luz. Luego, las tinciones se removieron mediante centrifugación a 400 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados con PBS. Inmediatamente, las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI, sin FBS, y fueron analizadas en el Citómetro de flujo FACS canto II. Para el análisis de los datos se emplearon los programas FlowJo vX.0.7 o FACS Diva *software* (Becton Dickinson. BD). Como controles para ajustar los cuadrantes se emplearon células sin marcación, células no inoculadas con rotavirus que fueron cultivadas en presencia o no de FBS y células tratadas con 20nM de Doxorubicina durante iguales tiempos de cultivo que las células inoculadas con rotavirus.

3.1.19 Evaluación de la expresión de Caspasa 8 y 3

Para evaluar la expresión de Caspasa 8 y 3 se emplearon los kit de análisis de caspasas Vybrant® FAM Caspase-3 and -7 Assay Kit (Life Technologies. V35118) y Vybrant® FAM Caspase-8 Assay Kit (Life Technologies. V35119). Las células Reh fueron inoculadas previamente con el rotavirus Wt1-5 con MOI de 1 y 2, sin FBS, en cajas de 48 pozos. Transcurridas 24 h.p.i las células fueron recuperadas, centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos y se realizaron dos lavados con PBS. Luego 1×10^6 células/ml, se transfirieron en 300 μ l a tubos de citometría, inmediatamente se adicionaron 10 μ l del reactivo de trabajo FLICA (30X) directamente a la suspensión celular, se mezcló e incubó protegiendo de la luz durante 60 minutos a 37 °C con 5% de CO₂. Posteriormente se realizaron dos lavados con 1 ml de Buffer de lavado del kit y las células fueron precipitadas mediante centrifugación a 400 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 400 μ l del mismo Buffer. Se detectó la fluorescencia con el filtro de excitación de 488 nm y el filtro de emisión verde en el Citómetro de flujo BD-FACS ARIA II. Se configuró el Citómetro de modo que las células viables se encentraran en el cuadrante apropiado. Para el análisis de los datos se emplearon los programas FlowJo vX.0.7 o FACS Diva software (Becton Dickinson. BD). Como controles se establecieron células a las cuales no se les inoculo rotavirus y células a las que se les inoculo con el aislamiento Wt1-5 previamente inactivado con luz UV con un MOI de 2 durante los mismos tiempos del ensayo.

3.1.20 Evaluación de la fragmentación del DNA mediante ensayo de TUNEL

Para evaluar fragmentación en el DNA luego de la infección con el rotavirus Wt1-5 adaptado se utilizó el método *in situ* cell death detection Kit, POD (TUNEL, Roche Cat. No. 11 684 817 910). Las células fueron inoculadas previamente con el rotavirus Wt1-5 con MOI desde 0.1 hasta 6 sin suplemento de FBS como se describió anteriormente, en cajas de 48 pozos. Transcurridas 24 h.p.i las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7.4) a temperatura ambiente (16-25 °C) durante 60 minutos, se les removió el medio de cultivo mediante centrifugación a 400 x g durante 5 minutos y se realizaron dos lavados con PBS. Para el ensayo las células Reh fueron dispensadas sobre láminas cubreobjetos, se les adiciono buffer de bloqueo (H₂O₂ al 3% en Metanol), nuevamente se realizaron dos lavados con PBS y las células fueron permeabilizadas con triton X-100 al

0.5% (vol/vol) + citrato de sodio al 0.1% durante 5 minutos sobre hielo (2-8 °C), luego se realizaron dos lavados con PBS. Seguidamente se adicionaron 30 µl de la solución TUNEL de trabajo (mezcla de la enzima recombinante terminal nucleótidil transferasa de timo de ternero obtenida en *E. coli*. con la solución de marcación que contiene los nucleótidos en Buffer de reacción) por cada laminilla y fue incubada durante 60 minutos a 37 °C en cámara húmeda, protegido las láminas de la luz. Como control negativo de la tinción se incubaron células fijadas, permeabilizadas y solamente se adicionó la solución de marcación sin la enzima de reacción de TUNEL. Como control positivo de la tinción se incubaron las células fijadas y permeabilizadas con DNase I recombinante, grado I (3 U/ml en 50 mM de tris-HCL, pH 7.5, 10 mM de MgCl₂ y 1% de BSA) por 10 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C) para inducir las rupturas en el DNA antes de los procesos de marcación. Como controles del ensayo se establecieron células a las cuales no se les inoculó rotavirus y células tratadas con 1 mM de H₂O₂ durante los mismos tiempos evaluados. Simultáneamente se evaluó la presencia de antígenos rotavirales y núcleos, para ello se adicionó el suero hiper inmune contra proteínas estructurales del rotavirus 1:2000 vol/vol diluidos en PBS + BSA al 1% durante 1 h a 37 °C, se efectuaron dos lavados con PBS y se adicionó 0.88 µg/ml de anticuerpo secundario conjugado Cabra anti conejo conjugado con Alexa 568 (Santa Cruz SC-2780) diluido en PBS + BSA al 1% durante 40 minutos a 37 °C protegidos de la luz. Luego, se adicionó 0.1µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C protegiendo de la luz.

El porcentaje de células Reh positivas para TUNEL y/o antígenos rotavirales fue determinado en el total de la población contando las células positivas y negativas en cada laminilla; el número de células positivas se dividió por el total de células. Para la evaluación se tomaron cinco fotografías representativas de cada laminilla en un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1 con el objetivo de 60 X (Nikon). Las imágenes se obtuvieron con el programa NIS-Elements Advanced Research (Nikon). Las imágenes se analizaron por medio del programa ImageJ 1.44 [Java 1.6.0 20](#) de 32-bit.

3.1.21 Evaluación de la fragmentación del DNA mediante electroforesis

Se empleó el kit Apoptotic DNA ladder (Roche® Cat 11835246001). 2 x 10⁶ células/ml fueron infectadas con un MOI de 1 y 6 como se describió anteriormente. Se colectaron las células a las 12 y 24 h.p.i., se adicionó 0.5 mM de PMSF (inhibidor de proteasas) y se

congelaron las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para realizar la extracción y recuperación del DNA celular, se emplearon tubos filtro provistos de una membrana de fibra de vidrio. Se usaron 2×10^6 células en un volumen de $200\text{ }\mu\text{l}$ de PBS, a las que se les adicionó $200\text{ }\mu\text{l}$ de buffer de lisis (6M de Guanidina-HCl, 10 mM de Urea, 10 mM de tris-HCl, 20% (Vol/Vol) de Triton X-100. pH 4.4) mezclando inmediatamente. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente ($\sim 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se adicionó $100\text{ }\mu\text{l}$ de isopropanol agitando en vortex durante 1 minuto. Se combinó un tubo filtro y un tubo colector depositando la muestra en el reservorio superior, luego se centrifugó a $6,2\text{ g}$ en centrifuga IEC MicroCL 17 (Thermo electron corporation®). Se descartó el fluido que paso por el filtro y nuevamente se combinaron el tubo filtro y el tubo colector, inmediatamente se adicionó en el reservorio superior $500\text{ }\mu\text{l}$ de buffer de lavado (80 % de etanol absoluto, 29 mM de NaCl y 2 mM de Tris-HCl, pH 7,5) y se centrifugó por 1 min a $6,2\text{ g}$ y luego 10 segundos a $16,2\text{ g}$, hasta remover el buffer de lavado residual. Se descartó el tubo colector y se insertó el tubo filtro con un tubo estéril de 1,5 ml. Para eluir el DNA atrapado en el filtro se usaron $200\text{ }\mu\text{l}$ de buffer de elución (10 mM de Tris-HCl, pH 8,5) precalentado a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, repitiendo el procedimiento dos veces. Se adicionó el buffer de elución en el tubo filtro y se centrifugó durante 1 minuto a $6,2\text{ g}$, almacenando la muestra a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su análisis posterior en un periodo no mayor a 14 días. Se tomó una alícuota de cada una de las muestras para cuantificar la pureza de la muestra en Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y se obtuvo un porcentaje de pureza del 94% y una concentración promedio de $200\text{ ng}/\mu\text{l}$. Como controles del ensayo se establecieron células a las cuales no se les inoculo rotavirus, células tratadas con 1 mM de H_2O_2 durante los mismos tiempos del ensayo y células a las que se les inoculo con el aislamiento Wt1-5 previamente inactivado con luz UV con un MOI de 2.

Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1% ($10 \times 10\text{ cm}$). Se mezcló $2\text{ }\mu\text{g}$ de DNA purificado con buffer de carga (stock 10X con 0,1 de SDS, 25 mg de Azul de Bromofenol, 3 ml de glicerol y 7 ml de agua destilada miliQ). Las muestras se depositaron en los bolsillos usando una micropipeta y se aplicó un voltaje de corrido de 75 V ($5\text{ V}/\text{cm}$) durante 1,5 horas. Se visualizó el DNA con SyBR® Safe DNA gel Stain (Life Technologies, Cat S33102) en un foto documentador de geles.

3.1.22 Evaluación de la expresión de la Poli ADP- Ribosa Polimerasa (PARP) mediante inmunofluorescencia

Se evaluó la expresión de la proteína Poli ADP ribosa polimerasa mediante el uso de un anticuerpo policlonal de conejo (Anti-Ploy-(ADP-Ribose)-Polymerase, Roche Cat. No. 11835238001). Las células fueron inoculadas previamente con el rotavirus Wt1-5 con MOI desde 0.1 hasta 6 sin suplemento de FBS como se describió anteriormente en cajas de 48 pozos. Transcurridas 24 h.p.i las células fueron fijadas con metanol absoluto frío (-15 a -25°C) por 30 minutos, se les removió el medio de cultivo mediante centrifugación a 400 x g durante 5 minutos y se realizaron dos lavados con PBT (PBS +0.1% de BSA y 1% vol/vol de Tween 20). Para el ensayo, las células Reh fueron dispensadas sobre láminas cubreobjetos y se incubaron con 1µl/ml del anticuerpo de conejo anti Poli ADP ribosa polimerasa en buffer de bloqueo (50 mM de tris-HCl, pH 8, 150 mM de NaCl, 0.3% vol/vol de Tween 20 y 5% de leche descremada) durante 60 minutos a temperatura ambiente (15-25°C), a continuación las células fueron lavadas dos veces con Buffer PBT, e inmediatamente se incubaron con 0.88 µg/ml del anticuerpo secundario de burro anti conejo conjugado con FITC (Santa Cruz SC-2024) diluidos en PBS + BSA al 1% durante 40 minutos a 37 °C protegidos de la luz, nuevamente se realizaron dos lavados con PBS. Simultáneamente se evaluó la presencia de antígenos rotavirales y núcleos, para ello se adicionó el suero hiper inmune contra proteínas estructurales del rotavirus 1:2000 vol/vol diluidos en PBS + BSA al 1% durante 1 h a 37 °C, se efectuaron dos lavados con PBS y se adicionó 0.88 µg/ml de anticuerpo secundario cabra anti conejo conjugado con Alexa 568 (Santa Cruz SC-2780) diluido en PBS + BSA al 1% durante 40 minutos a 37 °C protegidos de la luz. Luego, se adicionó 0.1µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C protegiendo de la luz. Como control positivo de la tinción, las células fijadas y permeabilizadas se incubaron con DNase I recombinante, grado I (3 U/ml en 50 mM de tris-HCL, pH 7.5, 10 mM de MgCl₂ y 1% de BSA) por 10 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C) para inducir las rupturas en el DNA. Como controles del ensayo se establecieron células a las cuales no se les inoculo rotavirus y células tratadas con 1 mM de H₂O₂.

El porcentaje de células Reh positivas para PARP y para antígenos rotavirales fue determinado en el total de la población contando las células positivas y negativas en cada laminilla; el número de células positivas se dividió por el total de células. Para la evaluación

se tomaron cinco fotografías representativas de cada laminilla en un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1, con el objetivo de 40 X. Las imágenes se obtuvieron con el programa NIS-Elements Advanced Research (Nikon). El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ 1.44 [Java 1.6.0_20](#) de 32-bit.

3.1.23 Caracterización de la expresión de proteínas de membrana

Para analizar la expresión de las proteínas HSPs (90, 70, 60 y 40), Hsc70, integrina $\beta 3$ y PDI en la membrana citoplasmática se utilizó la técnica de citometría de flujo. Para esto, las células Reh en fase logarítmica de crecimiento, con viabilidad mayor al 95% aproximadamente, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Se adicionó 50mM de cloruro de amonio (NH_4Cl_2) y 0,1 M de Glicina en PBS durante 30 min a temperatura ambiente, e inmediatamente se adicionó 2 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos policlonales (Santa Cruz) de cabra anti-Hsp90 (sc-1055), Hsp70 (sc-1060), Hsp60 (sc-1052), Hsp40 (sc-1801), Hsc70 (sc-1059), integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ (sc-6627) o PDI (sc-17222) diluidos en PBS+BSA al 1% durante 1 h a 37 °C, se efectuaron dos lavados con PBS y se adicionó 0.88 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo secundario conjugado-FITC (Santa Cruz SC-2024) diluido en BSA al 1%, incubándolos durante 1 h a temperatura ambiente protegiendo de la luz. Se detectó la fluorescencia en Citómetro de flujo FACS canto II. Para el análisis de los datos se emplearon los programas FlowJo vX.0.7 o FACS Diva *software* (Becton Dickinson. BD). Anticuerpos de control de isotipo se usaron como control para ajustar los cuadrantes. Se determinaron los datos de intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada una de las proteínas y su control sin marcación.

3.1.24 Ensayo de co-localización de antígenos virales con las proteínas de membrana mediante microscopía confocal

Se sembraron 3.0×10^5 células por pozo en un volumen 400 μl , en cajas de 48 pozos. Las células sin suplemento de FBS fueron incubadas con el rotavirus Wt1-5 adaptado, como se describió anteriormente, con MOI 3 a 4 °C durante 60 minutos con el propósito de adherir el virus a la célula y evitar su internalización. Se tomó como tiempo inicial de infección cuando las células se pasaron de 4 °C a 37 °C. Las células se cosecharon y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS en los tiempos 0, 5, 15 y 30 min de incubarse a 37 °C. Se realizó el montaje de las muestras sobre láminas cubreobjetos adicionando 2

$\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos policlonales (Santa Cruz) de cabra anti-Hsp90 (sc-1055), Hsp70 (sc-1060), Hsp60 (sc-1052), Hsp40 (sc-1801), Hsc70 (sc-1059), integrina $\beta 3$ (sc-6627) o PDI (sc-17222) y suero hiper inmune de conejo dirigido contra proteínas estructurales de rotavirus a un factor de dilución de 1:2000, diluidos en PBS+BSA al 1% durante 1 h a 37 °C, efectuando posteriormente dos lavados con PBS. Consecutivamente se adicionó 0.88 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo secundario IgG anti cabra conjugado-FITC (Santa Cruz SC-2024) y 0.88 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo secundario IgG anti conejo conjugado-Alexa 568 (Invitrogen A11004) diluidos en BSA al 1%, junto con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). La incubación se hizo durante 30 min a temperatura ambiente protegiendo de la luz. A continuación las laminillas que contenían las muestras fueron invertidas sobre láminas porta objetos, realizando un montaje con glicerol al 70% y sellando los bordes con resina. Como controles se emplearon células sin marcación y anticuerpos de control de isotipo para realizar el ajuste en la potencia de los laser y de las intensidades de fluorescencia.

Para la evaluación se tomaron cuatro fotografías representativas de cada laminilla en el microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1 de 4 canales. Software EZ-C1. Ver. Gold. 3.90, con el objetivo Plan. Apoc. 100X/NA1.40/WD0.13 oil PFS. Se empleó el Pinhol small de 30 μm . Se realizó la adquisición de las imágenes con la herramienta Z-stack. Se realizó la adquisición de imágenes en 16 BITS, previniendo el desenfoque, sin saturar la imagen, en modo pseudocolor.

Con el propósito de analizar si los 2 fluorocromos (FITC y Alexa 568) están localizados en la misma estructura en un volumen 3D, el análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ 1.44 [Java 1.6.0_20](#) de 32-bit, realizando una aproximación estadística basada en coeficientes de correlación de intensidades (ICCB) sobre la imagen completa, mediante la medición de los coeficientes de Pearson y Mander's entre los valores de intensidades de fluorescencia de pixeles en gris entre los canales verde y rojo.

3.1.25 Ensayo de bloqueo

Se sembraron 2.0×10^5 células por pozo en un volumen 300 μl , en cajas de 48 pozos y se incubaron a 37 °C con 5% de CO_2 . Las células Reh en fase logarítmica de crecimiento o los linfoblastos LLA-B, con viabilidad promedio del 95%, fueron incubados con concentraciones de 4 $\mu\text{g/ml}$ (Dilución 1:50) y 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (Dilución 1:500) de anticuerpos

policlonales (Santa Cruz) de cabra anti-Hsp90 (sc-1055), Hsp70 (sc-1060), Hsp60 (sc-1052), Hsp40 (sc-1801), Hsc70 (sc-1059), integrina $\alpha V\beta 3$ (sc-6627) o PDI (sc-17222) y una concentración de 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (Dilución 1:500) de cada uno de los anticuerpos en una mezcla conjunta, diluidos en PBS+BSA al 1% durante 1 h a 37 °C. Se realizaron dos lavados con PBS para retirar los anticuerpos no unidos. Inmediatamente las células fueron inoculadas con una MOI de 2 del rotavirus Wt1-5 adaptado como se describió anteriormente. Las células fueron recolectadas luego de 24 h.p.i. y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS. Las células fueron permeabilizadas con triton X-100 al 0.5% (vol/vol) por 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados con PBS. Para disminuir la auto fluorescencia celular, se adicionó 50mM de cloruro de amonio (NH_4Cl_2) y 0,1 M de Glicina en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. En seguida se realizaron 2 lavados con PBS y se adicionó el suero hiper inmune contra proteínas estructurales del rotavirus 1:2000 vol/vol diluidos en PBS + BSA al 1% durante 1 h a 37 °C, se efectuaron dos lavados con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario conjugado FITC (0.88 $\mu\text{g/ml}$ Santa Cruz SC-2024) diluidos en PBS + BSA al 1% durante 30 minutos a 37 °C protegidos de la luz. Se detectó la fluorescencia en el Citómetro de flujo FACS canto II. Para el análisis de los datos se emplearon los programas FlowJo vX.0.7 o FACS Diva *software* (Becton Dickinson. BD). Anticuerpos de control de isotipo se usaron como control negativo para ajustar los cuadrantes. Se determinaron los datos de intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada una de las variables y su control sin marcación. Como control se establecieron células a las cuales no se les inoculo rotavirus. Se realizó el análisis de viabilidad con azul de tripan y resazurina. **Nota:** trabajos previos evaluaron la reactividad de los anticuerpos contra rotavirus sin encontrar positividad.

3.1.26 Ensayo de RT-PCR

Está basada en la obtención de cADN viral mediante transcripción reversa; se realizó con el Kit OneStep RT-PCR de QIAGEN®. La RT-PCR se realizó usando como molde el dsRNA viral según el protocolo establecido por OMS en el Manual de Métodos de detección y caracterización de Rotavirus, versión 1.2 de 24/02/2012 (228), al cual se le realizaron modificaciones en temperatura y tiempo de transcripción reversa, temperatura de hibridación, tiempo de extensión y número de ciclos: Las condiciones finales de reacción para este paso fueron:

- 1 ciclo de desnaturalización a 90°C por 1 minuto.
- 1 ciclo de transcripción reversa a 50°C por 25 minutos.
- 1 ciclo de desnaturalización de cADN a 95°C por 15 minutos.
- Una fase de 20 ciclos así: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 45°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto.
- Fase de extensión final 1 ciclo a 72°C por 5 minutos.

Se utilizaron primers específicos para cada fragmento viral en reacción separada. Ver **Anexo 1**. Se obtuvieron amplicones de 896 y 876 pb para el genotipo G y P respectivamente.

3.1.27 Identificación de genotipos del aislamiento Wt1-5 por PCR semi-anidada

La identificación de genotipos se realizó por PCR multiplex semianidada, usando como molde los amplicones de los genes VP7 y VP4 obtenidos previamente. La reacción fue llevada a cabo utilizando la enzima Platinum® TaqPCR. Se siguieron las condiciones y perfiles térmicos descritos en el manual de la OMS (228), con algunas modificaciones en el tiempo de desnaturalización de cDNA, y la temperatura de hibridación. Las condiciones finales fueron:

- 1 ciclo de desnaturalización de cADN a 94°C por 2 minutos
- Una fase de 30 ciclos así: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, anillamiento a 45°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto.
- Fase de extensión final 1 ciclo a 72°C por 5 minutos.

Para el gen VP7 se realizó mezcla de “primers” usando como forward 9con1 -L y primers internos reverse para genotipos G1, G2, G3, G4, G8 y G9. Para el gen VP4 se realizó mezcla de primers usando como forward Con 3 y primers internos reverse para genotipos P4, P5, P8, P9, P10 y P11.

Se realizó separación electroforética de los fragmentos de cDNA VP7 y VP4 obtenidos en la PCR-semi-anidada en gel de agarosa (Invitrogen) al 2% en buffer TAE 1X, teñido con SYBR® Safe (Invitrogen). Como buffer de carga se utilizó loading buffer (Invitrogen) y marcador molecular de DNA 100pb (Invitrogen). El corrido electroforético se realizó a 120 voltios durante 60 minutos y las bandas se observaron bajo luz UV en documentador de geles BioRAD.

4. Capítulo 4. Resultados

El propósito del presente estudio fue evaluar el potencial efecto oncolítico de un aislamiento de rotavirus, el cual fue previamente adaptado *In vitro* al crecimiento en líneas celulares tumorales. Hemos atendido a las recomendaciones dadas por el International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) siendo importante demostrar inicialmente la selectividad replicativa del rotavirus Wt1-5 adaptado en células tumorales mediante la ejecución de ensayos *In vitro* para desarrollar la prueba concepto (POC) que incluya la evaluación de los aspectos relacionados con la bioactividad, el potencial mecanismo de acción y la caracterización de la citotoxicidad. Nosotros hemos evaluado la capacidad infecciosa del rotavirus Wt1-5 adaptado en la línea celular Reh de leucemia linfocítica aguda y en linfoblastos recuperados de sangre periférica de pacientes en edad pediátrica diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores B (LLA-B) que no habían iniciado tratamiento al momento de la recolección de la muestra, usando como control de células no tumorales las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

4.1 Infección de células Reh por el rotavirus Wt1-5

Para buscar si la línea celular Reh es susceptible a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado, se llevaron a cabo diferentes ensayos en células Reh en fase logarítmica de crecimiento, las cuales fueron inoculadas o no con el aislamiento de rotavirus Wt1-5 empleando multiplicidades de infección (MOI) desde 0.1 hasta 6, en medio de cultivo sin suero fetal Bovino (FBS). Adicionalmente, se llevaron a cabo algunos ensayos suplementando el cultivo con 5% de FBS luego de 1 hora de la inoculación viral con el propósito de evaluar la posibilidad de su uso en los ensayos con linfoblastos LLA-B. Las células inoculadas con el rotavirus Wt1-5 se sometieron a análisis inmunoquímico luego de 24 h.p.i. evaluando la presencia de proteínas estructurales de rotavirus (VP) empleando suero inmuno específico. Se encontró que el porcentaje de células positivas para antígenos estructurales de rotavirus incrementaba con el aumento de la MOI (**Fig. 1A**), siendo mayor en las células cultivadas sin suplemento de FBS, con un máximo de positividad entre 60-70 %. Se hallaron diferencias significativas en la expresión de antígenos rotavirales a partir de la MOI de 0.5 al compararlos con los grupos control de células inoculadas con el virus

inactivado con luz UV o células no infectadas. En las fotografías de los ensayos de inmunocitoquímica se observan los cambios en la acumulación de antígenos estructurales rotavirales en las células inoculadas con el rotavirus Wt1-5 relacionados con la MOI empleada (**Fig. 1B**). Comparativamente se observa una mayor acumulación de antígenos en las células sin suplemento de FBS al compararlas con los demás grupos de células que habían sido inoculadas con rotavirus Wt1-5 inactivado con luz UV. Adicionalmente, se muestran los controles metodológicos de células no infectadas, células inoculadas o no con el rotavirus Wt1-5, que fueron analizadas exclusivamente con el anticuerpo secundario para determinar la especificidad de los anticuerpos primarios.

El análisis de citometría de flujo para antígenos estructurales de rotavirus en células cultivadas sin suplemento de FBS mostró que la inoculación con rotavirus Wt1-5 daba como resultado una proporción creciente de células positivas a antígenos de rotavirus de acuerdo con el aumento en las MOI, en comparación con las células inoculadas con el virus inactivado con UV, encontrando un máximo de positividad de alrededor del 50.1 % en la MOI3 y un 1.2% en el grupo control (**Fig. 1C**). Al analizar la intensidad media de fluorescencia (MFI) del ensayo de la *Fig. 1C*, se evidencia igualmente un incremento en la señal de fluorescencia para las células positivas al antígeno vírico de acuerdo con el aumento en las MOI utilizadas, obteniendo su máximo valor en la MOI de 3 (**Fig. 1D**).

Mediante ensayos de inmunocitoquímica se examinó la acumulación porcentual de antígenos virales entre las 2 a las 48 h.p.i. en células inoculadas o no con una MOI de 2 del rotavirus Wt1-5. Este ensayo mostró que el rotavirus Wt1-5 adaptado ciertamente se multiplicó en células Reh, al reportar una cinética de acumulación de antígenos estructurales tan tempranamente como las 4 h.p.i. (alrededor del 8%), y un máximo a las 48 h.p.i. (alrededor del 55%) en las células sin suplemento de FBS. Igualmente se muestra una tendencia similar aunque con valores menores en la acumulación de antígenos en las células con suplemento de FBS. Al observar los cambios entre las 12 y 24 h.p.i. se evidencia incremento porcentual de aproximadamente el doble, pero entre las 24 y 48 h.p.i. solo se observa ligero aumento en la acumulación de antígenos. (**Fig. 1E**). Se evaluó la presencia de antígenos estructurales de rotavirus en el sobrenadante de los cultivos de células inoculadas o no con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI 0.5-6) luego de 24 h.p.i. mediante ELISA tipo HADAS. Los antígenos se recuperaron en la fracción de sobrenadante mediante centrifugación a 700g. Se detectó un incremento en la densidad

óptica ($\Delta OD_{492\text{ nm}}$) que indica la presencia de antígenos virales en el sobrenadante, mostrando una acumulación asociada al aumento de las MOI utilizadas en el ensayo de infección, siendo mayor para las células sin suplemento de FBS en comparación con las células suplementadas con FBS (**Fig. 1F**). En este ensayo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las MOI de 1, 2 y 3.

Para realizar una aproximación del ciclo replicativo del rotavirus Wt1-5 adaptado en la línea celular Reh, se recolectaron extractos del sobrenadante tomadas en los puntos de tiempo posteriores a la infección descritos en la *Fig. 1E*. Alícuotas de estos extractos fueron posteriormente activadas con tripsina y adicionadas a un nuevo cultivo de células Reh empleando diferentes diluciones para hallar las unidades formadoras de foco (FFU/ml) con ensayos de dilución máxima y analizadas mediante inmunocitoquímica. Se encontró que estos inóculos podían producir nuevas partículas virales infecciosas desde las 6 h.p.i. (**Fig. 1G**). En este ensayo se encontró un incremento exponencial en las FFU entre las 12 y 24 h.p.i., estancándose entre las 24-48 h.p.i. Todos los análisis y valores de la desviación estándar (SD) se basaron en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

El análisis de los resultados sugiere que la línea células Reh de leucemia linfocítica aguda es susceptible a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado de forma dependiente de la MOI empleada, permitiendo la formación de viriones con capacidad infecciosa, los cuales completan su ciclo replicativo alrededor de las 8-12 h.p.i. La presencia del FBS reduce discretamente la infección rotaviral.

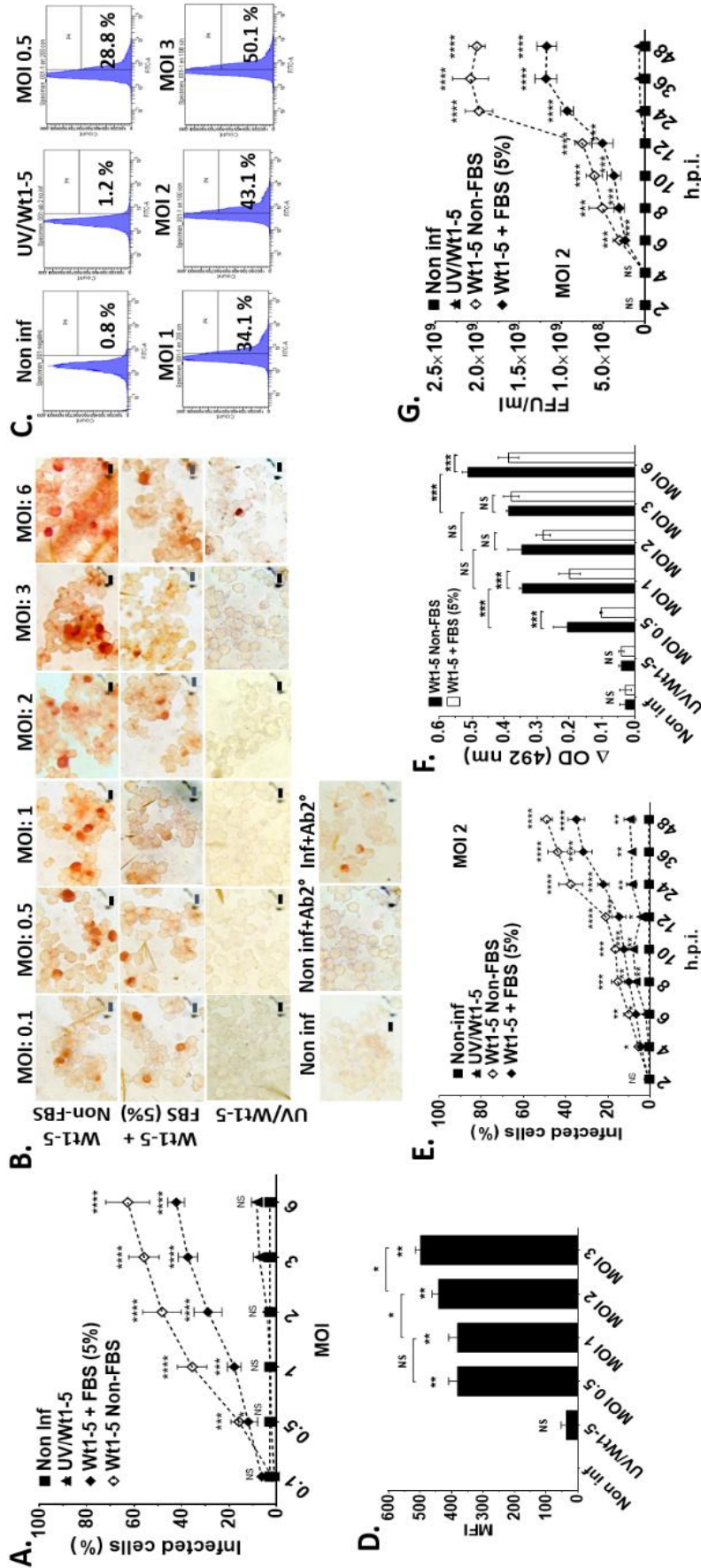


Figura 1. La línea celular Reh es susceptible a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado.

En la **Fig. 1A** se muestra la línea celular tumoral Reh en fase logarítmica de crecimiento la cual fue inoculada o no con el rotavirus adaptado Wt1-5 (MOI 0.1-6) previamente activado con tripsina, con o sin suplemento de FBS al 5%. Se empleó rotavirus previamente inactivado con luz UV con las mismas MOI (UV/Wt1-5). Se colectaron muestras para análisis inmunocitoquímico (HRP) contra proteínas rotavirales estructurales luego de 24 h.p.i. En la **Fig. 1B** se muestran las fotografías representativas del análisis inmunocitoquímico para proteínas estructurales de rotavirus luego de 24 h.p.i. de la **Fig. 1A**, la barra de escala representa un tamaño de 10 μm. Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo de 40 X. **Fig. 1C** y **Fig. 1D**: Análisis por citometría de flujo para antígenos estructurales rotavirales luego de 24 h.p.i. en células cultivadas sin FBS. La **Fig. 1C** muestra el porcentaje de células positivas para rotavirus y la **Fig. 1D** representa la intensidad media de fluorescencia (MFI) para antígenos rotavirales. Se usaron anticuerpos de control de isotipo para ajustar los cuadrantes. La **Fig. 1E** muestra el análisis inmunocitoquímico (HRP) contra proteínas rotavirales estructurales entre las 2-48 h.p.i. en células Reh inoculadas o no con MOI de 2, cultivadas con o sin suplemento de FBS al 5%. Se empleó rotavirus previamente inactivado con luz UV a la misma MOI. En la **Fig. 1F** se muestran los resultados de un ELISA en sándwich tipo HADAS para determinar la presencia de antígenos rotavirales en el sobrenadante de células Reh luego de 24 h.p.i. de haber sido inoculadas o no con rotavirus Wt1-5 previamente activado con tripsina (MOI 0.5-6), con o sin suplemento de FBS al 5%. Para la **Fig. 1G** se tomaron alícuotas de las células infectadas en los tiempos post-infección indicados en **Fig. 1E**, las cuales fueron congeladas y descongeladas dos veces, se sometieron a centrifugación a 700 g, se activó el sobrenadante mediante la adición de tripsina (1 μg/ml) para ser inoculado de nuevo en la línea celular Reh cultivadas con o sin suplemento de FBS al 5%. Luego de 12 h.p.i., las células fueron analizadas para determinar la producción de títulos infecciosos mediante la determinación de las proteínas estructurales de rotavirus usando el ensayo de inmunocitoquímica. Los valores de todos los ensayos representados corresponden a la mediana de tres experimentos independientes por condición.

4.2 Efectos de la inoculación con el rotavirus Wt1-5 sobre la viabilidad celular y la permeabilidad de la membrana celular

Para evaluar los efectos que presenta la inoculación con el rotavirus Wt1-5 adaptado sobre la viabilidad celular y la permeabilidad de la membrana celular entre las 0 - 48 h.p.i., las células Reh en fase logarítmica de crecimiento se inocularon con el rotavirus Wt1-5 activado con tripsina (MOI 1 a 6) en ausencia o presencia de FBS. La prueba de exclusión con Azul de Tripán mostró que la viabilidad celular disminuía continuamente a través de los puntos temporales estudiados posteriores a la inoculación viral (0, 12, 24, 36 y 48 h.p.i.) en las células sin suplemento de FBS (**Fig. 2A**) o con suplemento de FBS (**Fig. 2C**). En las células cultivadas sin suplemento de FBS la permeabilidad para el Azul de Tripán se incrementó desde las 12 h.p.i. para las células inoculadas con una MOI de 6 del rotavirus Wt1-5, encontrando una drástica reducción en la viabilidad, desde el 94% a las 0 h.p.i., el 20% entre las 12 - 24 h.p.i., y 0% luego de 48 h.p.i.; estos valores se acercan a los obtenidos en el grupo de células Reh control tratadas con 1 μ M de H₂O₂ a partir de las 24 h.p.i. Las MOI restantes (MOI 1, 2, 3) redujeron igualmente la viabilidad celular aunque comparativamente en una menor proporción. Estas diferencias son estadísticamente significativas al compararlas con los grupos de células control (células Reh no infectadas y células Reh inoculadas con rotavirus Wt1-5 UV inactivado a una MOI 2). Sin embargo, se encontró una reducción de la viabilidad hasta el 50% en las células Reh no infectadas entre las 36-48 h.p.i. Así mismo se observó una disminución de la viabilidad celular hasta el 50% entre las 24-36 h.p.i. para las células inoculadas con el virus UV inactivado (**Fig. 2A**). En las células Reh cultivadas con suplemento de FBS al 5% e infectadas con rotavirus Wt1-5 igualmente se encontró una tendencia hacia la reducción de la viabilidad celular aunque comparativamente con menores valores, con la salvedad que tanto las células no infectadas como las células inoculadas con el virus UV inactivado y las células inoculadas con la MOI de 1 mantuvieron una viabilidad celular entre el 90 y el 95% (**Fig. 2C**). Simultáneamente en estos ensayos mediante el uso de una cámara Neubauer se cuantificó el número de células presentes en el cultivo celular a través de los tiempos post-infección examinados (0-48 h.p.i.) en las células cultivadas sin (**Fig. 2B**) y con suplemento de FBS (**Fig. 2D**). En el grupo de células Reh cultivadas sin suplemento de FBS los resultados indicaron que se mantuvieron significativamente menos células morfológicamente identificables entre 12 y las 48 h.p.i. en las células inoculadas con el rotavirus Wt1-5 de forma relacionada con la MOI empleada, siendo mayor la reducción para la MOI de 6

(aproximadamente de $1,5 \times 10^6$ células/ml a las 0 h.p.i. hasta menos de 1×10^5 células/ml luego de 48 h.p.i.), acercándose a los valores obtenidos en los cultivos de células Reh tratadas con $1 \mu\text{M}$ de H_2O_2 . Las MOI restantes (MOI 1, 2, 3) también redujeron el número de células/ml aunque comparativamente en una menor proporción a partir de las 24 h.p.i., encontrando concentraciones intermedias. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar con los grupos de células control (células Reh no infectadas y células Reh inoculadas con rotavirus Wt1-5 UV inactivado a una MOI 2) donde el número de células se mantuvo entre $1,5 \times 10^6$ células/ml y 2×10^6 células/ml entre las 0-48 h.p.i. Las células no infectadas y las inoculadas con el virus UV inactivado mostraron un ligero aumento en el número de células entre las 0 y 24 h.p.i. probablemente debido a la proliferación celular inducida por los efectos residuales del FBS (**Fig. 2B**). En las células Reh cultivadas con suplemento de FBS también se halló una tendencia hacia la reducción en el número de células/ml aunque con una menor proporción al compararlas con las células sin suplemento de FBS. En este grupo, tanto las células no infectadas, las células inoculadas con el rotavirus UV inactivado y las células inoculadas con el rotavirus Wt1-5 a una MOI de 1 mostraron un aumento en la concentración celular pasando en promedio de $1,5 \times 10^6$ células/ml a $2,8 \times 10^6$ células/ml entre 0 y 36 h.p.i., probablemente debido a la proliferación celular inducida por FBS (**Fig. 2D**).

Para evaluar el decaimiento en el número de células generado por la infección rotaviral, las células Reh fueron marcadas con la tinción CellTrackerTM Blue CMAC Dye (Life Technologies), una sonda de marcación celular fluorescente que es retenida por las células hasta por 72 horas. Seguidamente las células Reh fueron inoculadas o no con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI 1 a 6) en medio de cultivo RPMI sin (**Fig. 2E**) y con (**Fig. 2F**) suplemento de FBS. El análisis de las unidades arbitrarias de fluorescencia (AUF) de las células Reh cultivadas sin FBS marcadas intracelularmente con la tinción reveló una reducción de las AUF para las células inoculadas con rotavirus de manera relacionada con la MOI empleada. Se obtuvo una reducción máxima de las AUF con una MOI 6, observando una disminución del 30-37% entre las 24 y 48 h.p.i. La reducción de las AUF fue menor para las MOI de 2 y 3, aproximadamente entre el 5-10% respectivamente. La fluorescencia permaneció constante (2000 AUF) para las células de los grupos control (células inoculadas con rotavirus inactivado con UV o células no infectadas) y para las células inoculadas con la MOI 1. Por el contrario, la fluorescencia relativa se redujo alrededor de un 80-90% en las células tratadas con $1 \mu\text{M}$ de H_2O_2 entre las 24-48 h.p.i.

(**Fig. 2E**). Se obtuvo una tendencia similar en el grupo de células cultivadas con FBS, encontrando una menor reducción en los valores de las AUF para todas las variables analizadas, exceptuando las células tratadas con $1\mu\text{M}$ de H_2O_2 , donde se obtuvieron valores comparables a los hallados en las células cultivadas sin FBS (**Fig. 2F**). Adicionalmente se evaluó la integridad celular cuantificando la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de los cultivos entre las 0-48 h.p.i., tanto para células Reh sin FBS (**Fig. 2G**) y con FBS (**Fig. 2H**). Los resultados muestran una elevación en las U/L de la LDH desde las 12 h.p.i. en las células sin FBS que fueron infectadas con el rotavirus Wt1-5 adaptado a medida que aumenta la MOI empleada. Se encontró una mayor elevación para la MOI de 6, partiendo de 180 U/L aproximadamente a las 0 h.p.i. hasta 800 U/L luego de 48 h.p.i. Las MOI de 1, 2, 3 produjeron una elevación promedio en los niveles de LDH desde 180 U/L hasta 550, 600 y 630 U/L respectivamente luego de 48 h.p.i. En los grupos de células inoculadas con rotavirus inactivado con UV o las células no infectadas, los niveles de LDH se mantuvieron con un valor de alrededor de 160-300 U/L entre las 0-48 h.p.i. Las células tratadas con $1\mu\text{M}$ de H_2O_2 mostraron un valor promedio máximo de 800 U/L en los tiempos analizados (**Fig. 2G**). En las células cultivadas con FBS los MOI de 3 y 6 mostraron niveles de LDH similares a los obtenidos en el anterior ensayo, al igual que las células tratadas con H_2O_2 . Sin embargo, los MOI de 1 y 2 mostraron una elevación discretamente mayor que las células de los grupos control (células inoculadas con rotavirus inactivado con UV o células no infectadas), con valores de LDH entre 160-320 U/L entre las 0-48 h.p.i. (**Fig. 2H**). Estos resultados indican cambios similares en los perfiles de viabilidad celular a los encontrados con la prueba de exclusión de Azul de Tripán. La actividad de LDH presente en la fracción de sobrenadantes sugiere que la permeabilidad de la membrana celular se ve significativamente afectada por la infección por el rotavirus Wt1-5 de las células Reh de una manera MOI dependiente. Estos cambios se muestran en las fotografías representativas de los cultivos de células Reh inoculadas o no con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI 0.1-6) en presencia o ausencia de FBS a las 12 h.p.i. (**Fig. 2I**) y a las 24 h.p.i. (**Fig. 2J**). Para las dos condiciones se reconocen cambios en la morfología celular, visualizando irregularidades el contorno celular para las células inoculadas con rotavirus, siendo más evidentes en las MOI más altas a medida que transcurren los periodos de tiempo analizados (0-24 h.p.i). Estos cambios son comparables a los observados en las células tratadas con H_2O_2 . En las células no infectadas o las células inoculadas con el virus UV inactivado no se observaron estos cambios en la morfología celular. En conjunto estos resultados revelan que la infección por el rotavirus Wt1-5

adaptado disminuye significativamente tanto la viabilidad celular, el número de células y la integridad de las células Reh después de 12 h.p.i. y que este efecto es más evidente a valores de MOI más altos y tiempos de post-infección más largos.

4.3 Efecto de la infección por el rotavirus Wt1-5 sobre la actividad redox, el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la permeabilidad de la membrana celular

Con el fin de evaluar si la inoculación con el rotavirus Wt1-5 adaptado induce cambios celulares relacionados con citotoxicidad, se realizaron diferentes ensayos en las células Reh que fueron infectadas con rotavirus. Se analizó el efecto de la infección sobre la actividad redox empleando el ensayo de Resazurina en células Reh inoculadas o no con rotavirus Wt1-5 con MOI 0.1 - 6 en ausencia (**Fig. 3A**) o presencia (**Fig. 3B**) de FBS luego de 12 y 24 h.p.i. En las células cultivadas sin FBS luego de 12 h.p.i., los resultados mostraron una disminución en la actividad oxidorreductiva mitocondrial desde un 100% de actividad, hasta mantener aproximadamente un 50%, 30% y 15% de la misma para las MOI de 2, 3 y 6 respectivamente. Durante este periodo de tiempo no se observaron cambios para las células Reh inoculadas con las MOI de 0.1, 0.5 y 1, ni en las células inoculadas con el virus UV inactivado o en las células no infectadas. Para las células tratadas con H₂O₂ la actividad se redujo al 0%. Luego de 24 h.p.i. se encontró una mayor reducción de la actividad oxidorreductiva mitocondrial hasta mantener aproximadamente un 50%, 22%, 8% y 3% de actividad para las MOI de 1, 2, 3 y 6 respectivamente. No se encontraron cambios significativos en los grupos control (**Fig. 3A**). En el grupo de células infectadas con rotavirus y cultivadas con FBS los efectos sobre la actividad oxidorreductiva fueron menos evidentes luego de 12 h.p.i., manteniendo una actividad del 80% para la MOI de 6. Sin embargo, luego de 24 h.p.i. se encontró que las células infectadas redujeron la actividad oxidorreductiva hasta el 40% de manera uniforme para las MOI de 2, 3 y 6. No se encontraron cambios significativos en los grupos control (**Fig. 3B**). Las imágenes que acompañan a las **Fig. 3A** y **Fig. 3B** en la parte inferior corresponden a fotografías representativas del ensayo de Resazurina a las 12 y 24 h.p.i., la cual presenta una coloración azul débilmente fluorescente hasta que se reduce irreversiblemente por acción de las oxidorreductasas mitocondriales a Resorufina que es de color rosa fluorescente, utilizándose como un indicador del estado oxidorreductivo en ensayos de viabilidad celular.

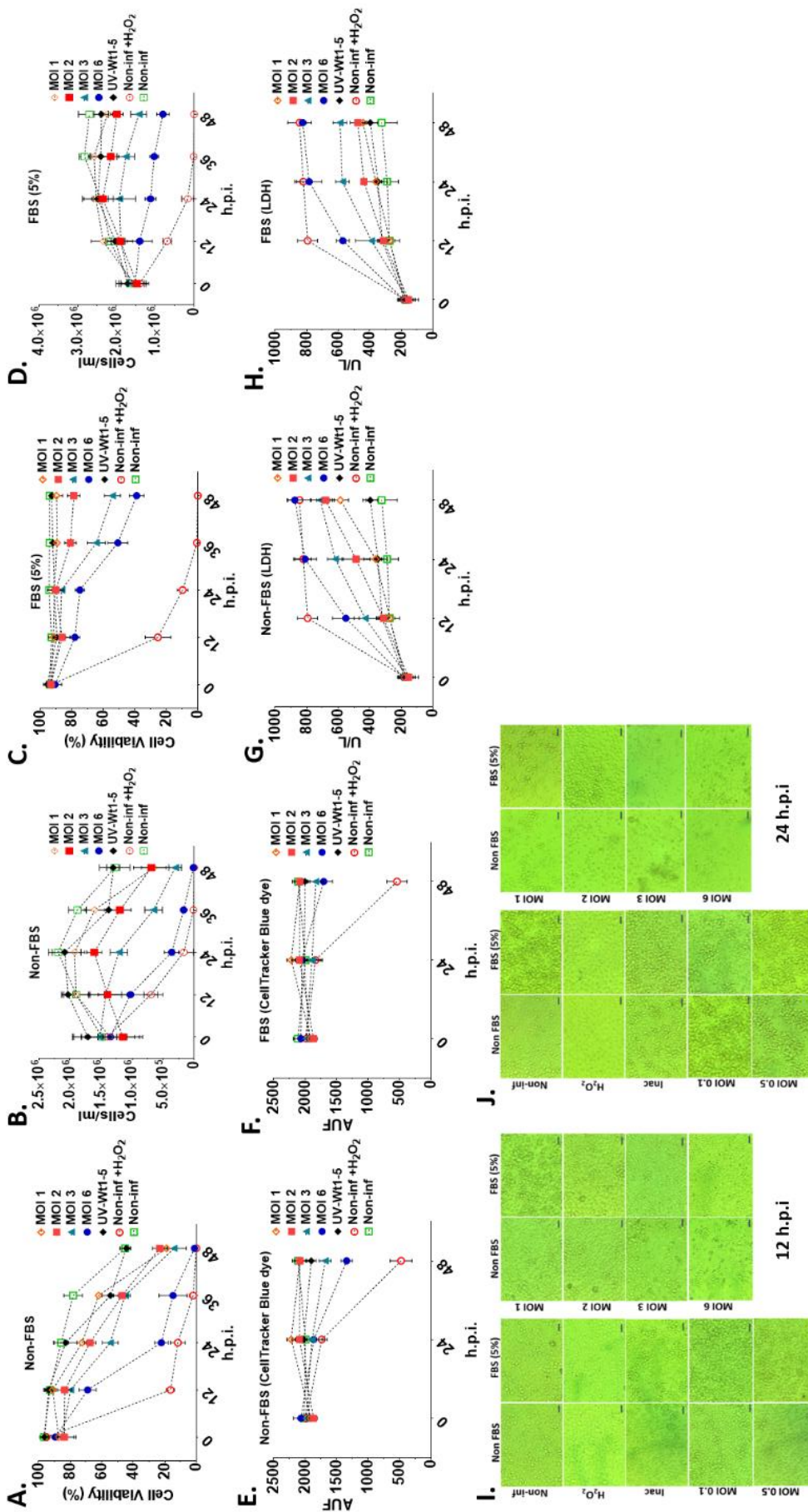


Figura 2. El rotavirus Wt1-5 adaptado disminuye la viabilidad celular y produce alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular. La línea celular tumoral Reh en fase logarítmica de crecimiento fue inoculada o no con el rotavirus adaptado Wt1-5 (MOI 1-6) previamente activado con tripsina, con o sin suplemento de FBS al 5%. Se emplearon como controles células inoculadas con rotavirus previamente inactivado con luz UV (UV/Wt1-5 con MOI 2) y células Reh no infectadas que fueron tratadas con 1 μ M de H₂O₂. En las **Fig.2A** y **Fig.2C** se colectaron alícuotas cada 12 hrs hasta las 48 h.p.i. determinando el porcentaje de viabilidad celular con el test de exclusión del Azul de Tripán en ausencia de FBS (**Fig.2A**) o en presencia de FBS al 5% (**Fig.2C**). En las **Fig.2B** (Sin FBS) y **Fig.2D** (Con FBS al 5%) se determinó el número de células viables, en los tiempos post-infección indicados, usando una cámara de Neubauer. En las **Fig.2E** (Sin FBS) y **Fig.2F** (Con FBS al 5%) se muestra el análisis de decaimiento de la fluorescencia para células Reh que fueron marcadas previamente con CellTracker™ Blue CMAC Dye (Life Technologies) y se inocularon o no con rotavirus Wt1-5 (MOI 1-6). Se cuantificaron las unidades arbitrarias de fluorescencia (AUF) a las 0, 24 y 48 h.p.i. En las **Fig. 2G** (Sin FBS) y **Fig.2H** (Con FBS al 5%) se determinó la concentración de LDH en el sobrenadante de cultivo de células Reh inoculadas o no con rotavirus Wt1-5 (MOI 1-6) a las 0, 24, 36 y 48 h.p.i. Los valores graficados corresponden a la mediana de dos experimentos independientes, cada uno desarrollado por triplicado. En las **Fig. 2I** (12 h.p.i.) y **Fig.2J** (24 h.p.i.) se muestran fotografías representativas de los cultivos de células Reh inoculadas o no con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI 0.1-6) en presencia o ausencia de FBS al 5%. Como controles se emplearon el virus inactivado con luz UV (MOI 2) y células tratadas con 1 μ M de H₂O₂. La barra de escala representa un tamaño de 20 μ m. Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo de 20X.

Se valoró el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) con el reactivo DiOC6 (3) y la permeabilidad de la membrana celular usando 7-AAD en células Reh cultivadas sin FBS (**Fig. 3C**), o con FBS (**Fig. 3D**) inoculadas o no con rotavirus Wt1-5 (MOI 1- 6, analizadas luego de 12, 24 y 48 h.p.i. Los diagramas de puntos (Dot plots) de la citometría de flujo representan la combinación de ambas tinciones. Las células que mantienen tanto la integridad de la membrana citoplasmática así como el $\Delta\Psi_m$ (viables) están en el cuadrante inferior derecho. El cuadrante superior derecho representa las células que mantienen el $\Delta\Psi_m$ pero han perdido la integridad de la membrana citoplasmática (células necróticas). El cuadrante inferior izquierdo representa las células que mantienen la integridad de la membrana citoplasmática pero han perdido el $\Delta\Psi_m$ (células en apoptosis temprana) y finalmente, el cuadrante superior izquierdo representa las células que han perdido tanto la integridad de la membrana citoplasmática como el $\Delta\Psi_m$ (células en apoptosis tardía). Estos resultados indicaron que a las 12 h.p.i. el 81.3% de las células control no infectadas mantuvieron su $\Delta\Psi_m$ como lo sugirieron sus señales positivas para DiOC6 (3), mientras que la proporción de células positivas para 7-AAD fue muy baja. Sin embargo, el porcentaje de células positivas para 7-AAD aumentó significativamente a las 24 y 48 h.p.i. (40.5% y 15.3% respectivamente), sugiriendo que la ausencia de FBS afecta la integridad de las células Reh (**Fig. 3C**). Se encontraron resultados similares para las células inoculadas con virus inactivado por UV (MOI 2). En las células tratadas con doxorubicina los resultados mostraron que los porcentajes de células positivas para 7-AAD a las 12 y 24 h.p.i. fueron similares a los mostrados por las células no infectadas, mientras que la mayoría de las células tratadas con doxorubicina (88%) eran 7-AAD-positivas a las 48 h.p.i. En células infectadas con Wt1-5 (MOI 1-6) este etiquetado permitió distinguir una variabilidad en los porcentajes de positividad para las tinciones y sus respectivas combinaciones con relación a los MOI evaluados. Como tendencia general, se encontró una mayor proporción de células positivas para 7-AAD a medida que se incrementa el MOI y los tiempos pos infección (entre el 41.0% hasta el 55.7%). Sin embargo, esta tendencia no fue muy sistemática ya que algunos tiempos de infección más largos y las MOI más altas no necesariamente produjeron porcentajes más altos de células que sean simultáneamente positivas a 7-AAD y DiOC6 (3). Inesperadamente, se registró un aumento en el porcentaje de células viables a las 48 h.p.i. Esto puede explicarse por una disminución en el número de células infectadas que experimentan lisis debido a una infección viral (por ejemplo, las células infectadas mueren y las células no infectadas permanecen o proliferan por estímulo residual de FBS) (**Fig. 3C**). Comparativamente, los resultados obtenidos en células Reh

cultivadas con suplemento de FBS, indicaron que a las 12 h.p.i. el 98.2% de las células control no infectadas mantuvieron su $\Delta\Psi_m$ con un muy bajo porcentaje de células positivas para 7-AAD (0.1%), manteniéndose en estos rangos a las 24 h.p.i. Sin embargo, el porcentaje de células positivas para 7-AAD aumentó significativamente 48 h.p.i. (51.7%), probablemente debido a que durante este periodo no se realizaron cambios de medio de cultivo (**Fig. 3D**). Las células inoculadas con el virus UV inactivado (MOI 2) mostraron una reducción en el porcentaje células positivas para DiOC6 desde el 79.6% a las 12 h.p.i. hasta el 29.2 % a las 48 h.p.i., con un incremento en las células doblemente positivas a medida que transcurren los periodos de tiempo evaluados desde el 18.6% a las 12 h.p.i. hasta el 48.7 % a las 48 h.p.i. La mayoría de las células tratadas con doxorubicina (93.1%) eran 7-AAD-positivas a las 48 h.p.i. En este grupo de células, se encontró un incremento sistemático en la proporción de células doblemente positivas a medida que se incrementa el MOI y los tiempos pos infección (entre el 17.1% hasta el 47.6%) (**Fig. 3D**).

Las primeras señales de citotoxicidad inducidas por la inoculación con el rotavirus Wt1-5 (MOI 2) en células Reh sin suplemento de FBS se evaluaron mediante la detección de la exposición de la fosfatidilserina en la membrana celular externa. Los cambios de permeabilidad de la membrana celular se evaluaron usando la tinción con 7-AAD, mientras que los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Se analizaron imágenes representativas de estas tinciones a las 24 h.p.i. (**Fig. 3E**). Las células viables están representadas por aquellas que solo fueron positivas para la tinción de Hoechst 33342 (azul), mientras que las células que expresan fosfatidilserina en la membrana citoplasmática y han perdido la integridad de la misma fueron positivas tanto para la tinción de anexina V (verde) como de Hoechst 33342 (azul) (apoptosis temprana). Por otro lado, las células que exponen fosfatidilserina en su membrana celular externa, fueron positivas para la tinción de anexina V (verde), 7-AAD (rojo) y Hoechst 33342 (azul) (apoptosis tardía). Las células que habían perdido su integridad de membrana y que no tenían exposición a fosfatidilserina solo eran positivas para la tinción de 7-AAD (rojo) y Hoechst 33342 (azul) (necrosis) (**Fig. 3E**). El análisis cuantitativo de los porcentajes de células que son positivas para las diferentes tinciones descritas en la *Fig. 3E* se muestran en la **Fig. 3F**. Las células tratadas con doxorubicina, las células no infectadas y las células infectadas con Wt1-5 inactivado con UV se usaron como controles. La mayoría de las células infectadas con rotavirus a MOI 2 eran doblemente positivas para señales fluorescentes de 7-AAD y anexina V (55% en promedio), mientras que las células de control no infectadas eran en su mayoría negativas

para ambas tinciones (8% en promedio). Las células inoculadas con Wt1-5 inactivado con UV fueron ligeramente positivas para ambos marcadores fluorescentes (20% en promedio), mientras que las células tratadas con doxorubicina fueron predominantemente positivas para ambas señales fluorescentes (90% en promedio). Sin embargo, las señales fluorescentes no permitieron determinar el porcentaje de células infectadas por rotavirus, debido a que las células no podían ser fijadas ni permeabilizadas para la evaluación de antígenos rotavirales. Todos los análisis y valores de la desviación estándar (SD) se basaron en tres experimentos independientes realizados por duplicado.

4.4 Inducción de marcadores de muerte celular debido a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado

Para evaluar la expresión de marcadores de muerte celular, se realizó un análisis de la expresión de las proteínas BAX, Bcl-2, BID y caspasa 3 a las 24 h.p.i. utilizando microscopía de inmunofluorescencia de células infectadas con rotavirus Wt1-5 (MOI 2) cultivadas sin FBS. Las proteínas estructurales de rotavirus se detectaron con anticuerpos Alexa Fluor 568 (rojo), mientras que las proteínas BAX, Bcl-2 y caspasa 3 se detectaron con anticuerpos Alexa Fluor 488 (verde) y los núcleos se visualizaron con DAPI (azul) (**Fig. 4A**). Las señales fluorescentes para los marcadores de muerte celular evaluados en las células no infectadas fueron extremadamente débiles mientras que tales señales se potenciaron en gran medida para BAX, BID y caspasa 3 de células infectadas con Wt1-5 sin cambios en Bcl-2 (**Fig. 4A**). Las células no infectadas y tratadas con H₂O₂ también mostraron un incremento en las señales fluorescentes para las proteínas BAX, BID y caspasa 3, excepto para Bcl-2. La asociación entre la infección por virus y la expresión de marcadores de muerte celular fue evidente en las células infectadas con Wt1-5 (MOI 2) después del análisis cuantitativo de los porcentajes de células que eran positivas o negativas para los marcadores de muerte celular estudiados y las proteínas estructurales virales luego de 24 h.p.i. (**Fig. 4B**). Este análisis mostró una mayor proporción de células simultáneamente positivas entre proteínas estructurales rotavirales y las proteínas BID o Bcl-2 (88% y 75% respectivamente). La presencia simultánea entre antígenos virales estructurales y las proteínas BAX o caspasa 3 se detectó en un porcentaje significativamente menor de células que el encontrado para las proteínas celulares BID o Bcl-2 (entre el 28% y el 34 %).

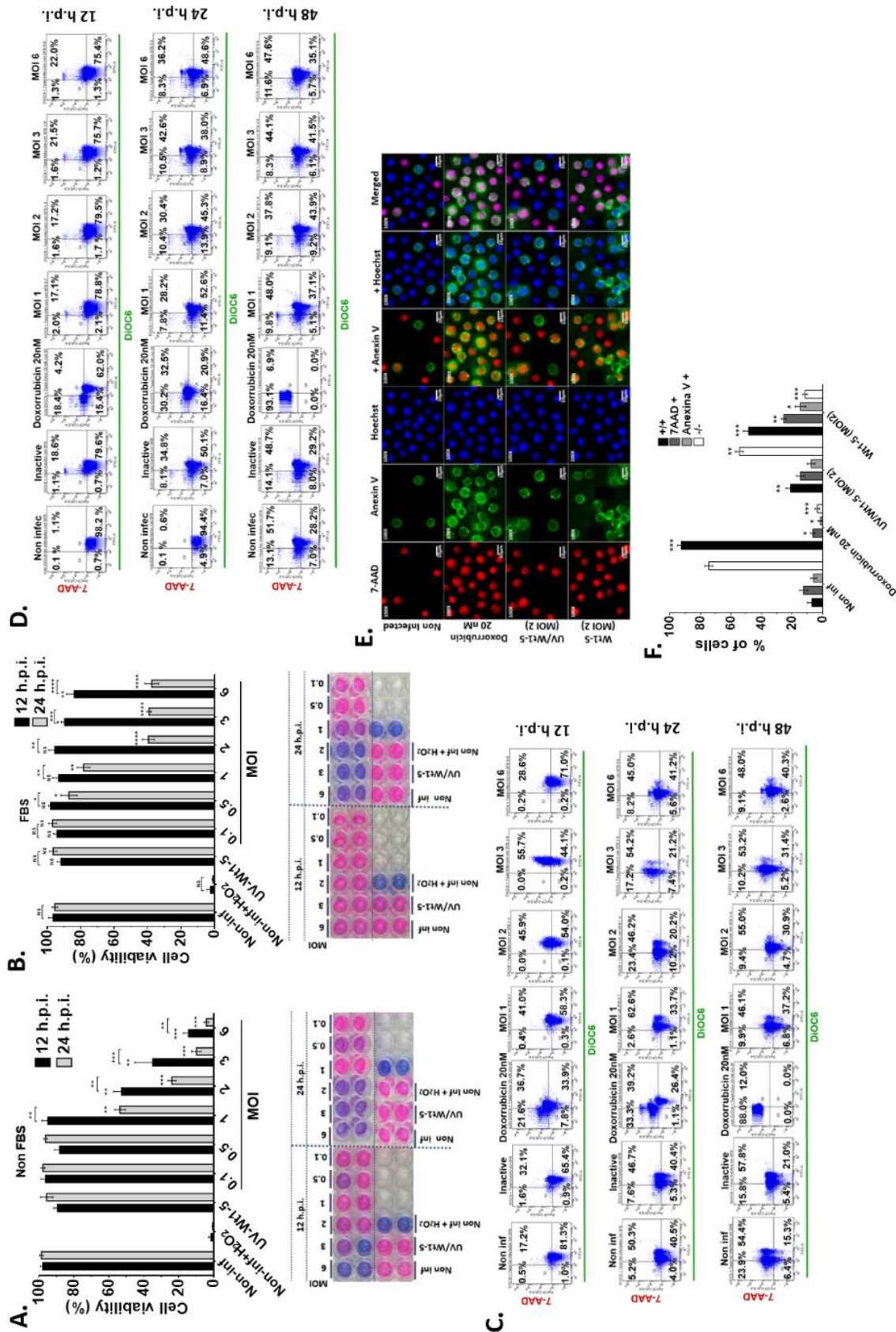


Figura 3. La infección por rotavirus WT1-5 afecta la actividad oxidorreductiva mitocondrial e induce una caída de potencial de membrana mitocondrial (delta ψ_m) y permeabilidad de la membrana citoplasmática en la línea celular Reh.
 La línea tumoral Reh en fase logarítmica de crecimiento fue inoculada o no con el rotavirus adaptado WT1-5 (MOI 1-6) previamente activado con tripsina, con o sin suplemento de FBS al 5%. En las **Fig. 3A** (sin FBS) y **Fig. 3B** (con FBS al 5%), se determinó el estado oxidorreductor de las células usando el ensayo de viabilidad celular con Resazurina luego de 12 h.p.i. y 24 h.p.i. La imagen que acompaña a la figura en la parte inferior corresponde a fotografías representativas de las placas de cultivo a las 12 y 24 h.p.i. respectivamente. Las **Fig. 3C** (SI FBS) y **Fig. 3D** (con FBS) muestran el análisis mediante citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) evaluado con DIOC6(3) y de la permeabilidad de la membrana citoplasmática evaluado con 7-AAD. Las células se analizaron luego de 12 h.p.i., 24 h.p.i. y 48 h.p. en presencia o ausencia de FBS al 5%. Se indican los porcentajes de cada cuadrante. En la **Fig. 3E** se evaluó la expresión de la fosfatidil serina en la membrana citoplasmática empleando Anexina V (FITC). La permeabilidad de la membrana citoplasmática se evaluó con 7-AAD y los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342. Se muestran las fotografías representativas del ensayo luego de 24 h.p.i. La barra de escala representa un tamaño de 10 μm . Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio invertido de escaneo láser Nikon C1. Software EZ-C1. Ver. 3.90. En la **Fig. 3F** se indican los porcentajes del análisis cuantitativo de las imágenes mostradas en la **Fig. 3E**. El análisis se realizó con el software ImageJ 1.44. [Java 1.6.0.20](#) de 32-bit. Los valores representados corresponden a la mediana de dos experimentos independientes por condición.

Los porcentajes de células que muestran señales positivas solo para BAX o caspasa 3 fueron similares a los encontrados para células que son simultáneamente positivas para proteínas estructurales virales y BAX o caspasa 3 (**Fig. 4B**).

Para analizar adicionalmente el efecto citotóxico de la infección por el rotavirus Wt1-5 (MOI 1 - 3) en las células Reh cultivadas sin FBS luego de 24 h.p.i., se analizó la expresión de los marcadores caspasa 3 y 8 activas. Los histogramas de la citometría de flujo de las células infectadas y no infectadas se superpusieron para evidenciar visualmente los cambios. El análisis de las células positivas y negativas indicó que los porcentajes de positividad para la caspasa 3 (entre el 68.7% y el 90.5%), como de la caspasa 8 (entre el 30.2% y el 59.0%) se incrementaron a medida que la MOI empleada también se incrementa, pero el aumento de la caspasa 3 fue más pronunciado que el de la caspasa 8 (**Fig. 4C**). La expresión incrementada de estas caspasas se relacionó positivamente con el aumento de las MOI en comparación con las células de no infectadas y las células infectadas con virus inactivados con UV (**Fig. 4C**).

Se evaluó la expresión de algunas proteínas relacionadas con muerte celular usando electroforesis SDS-PAGE con transferencia Western. Para esto se obtuvieron lisados de células infectadas con rotavirus Wt1-5 (MOI2) cultivadas sin FBS luego de 24 h.p.i. Este análisis usó anticuerpos contra las proteínas celulares BAX, BAX activado, Bcl-2, BID, pro-caspasa 3, caspasa 3 activada, citocromo C, COX-V, Smac/Diablo, rotavirus VP6 y β -actina (**Fig. 4D**). Se realizó el análisis la densidad relativa de las proteínas para cada variable encontrando que las células infectadas mostraron una expresión relativa aumentada de BAX activa, caspasa 3 activa y Smac/Diablo, mientras que Bcl-2 mostró una expresión disminuida en comparación con las células control no infectadas. Las células inoculadas con rotavirus Wt1-5 inactivado con UV mostraron una expresión aumentada de BID (**Fig. 4E**). En general, estos resultados sugieren que la infección por el rotavirus Wt1-5 en células Reh puede inducir mecanismos de muerte celular directos e indirectos relacionados a la MOI empleada y los tiempos pos infección analizados.

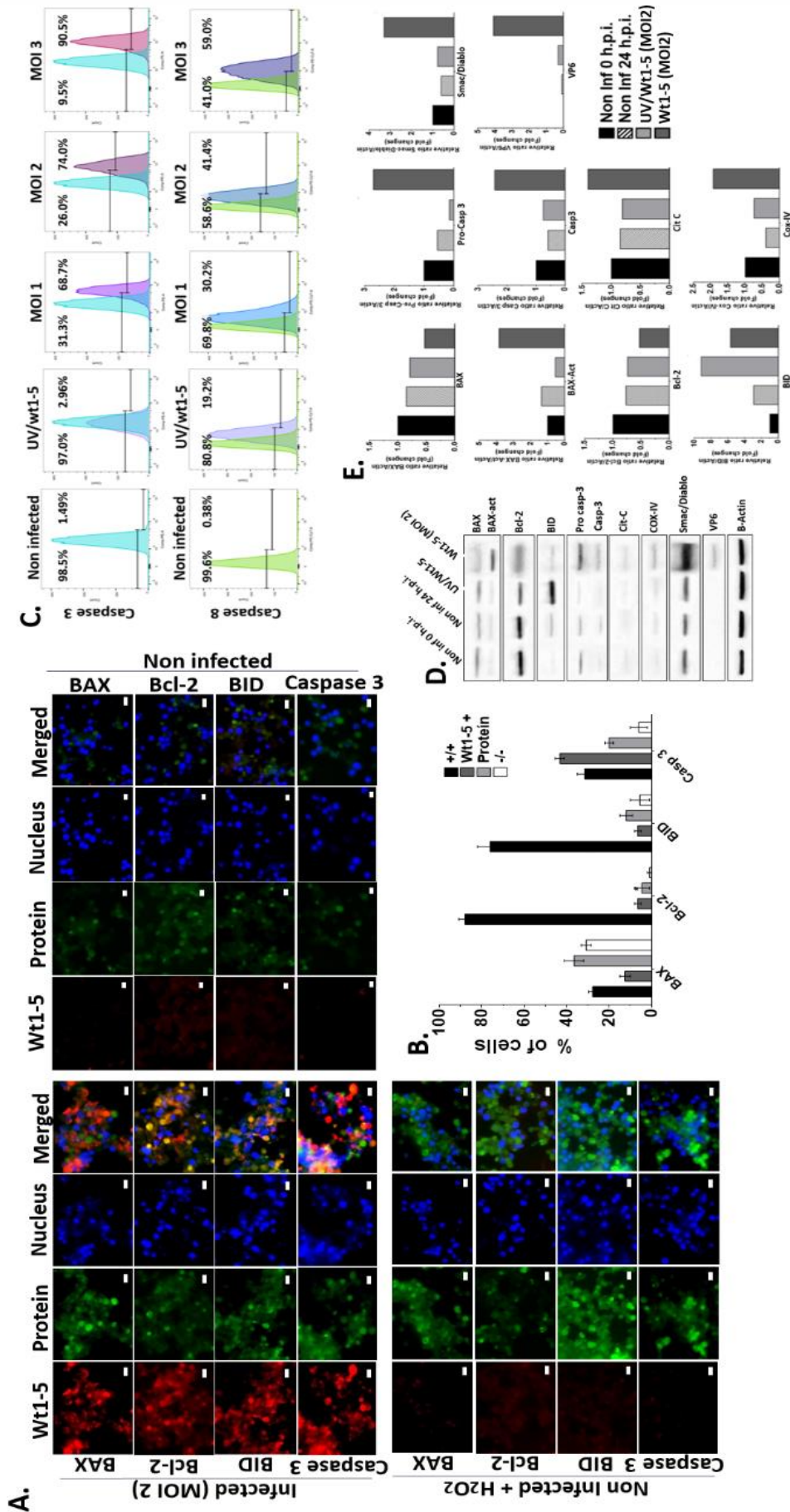


Figura 4. La inoculación con el rotavirus Wt1-5 adaptado induce señales relacionadas con muerte celular en la línea celular Reh.

La Fig. 4A muestra imágenes representativas del análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de las proteínas BAX, Bcl-2, BID y Caspasa 3 en células Reh en fase logarítmica de crecimiento inoculadas o no con el rotavirus adaptado Wt1-5 (MOI 2) previamente activado con tripsina. Luego de 24 h.p.i. las células fueron fijadas con PFA (paraformaldehído) y permeabilizadas. Se evaluó la expresión de las proteínas usando anticuerpos contra las proteínas estructurales (VP) de rotavirus (Alexa 568, rojo), anticuerpos contra las proteínas BAX, Bcl-2, BID y Caspasa 3 (Alexa 488, verde) y el núcleo fue visualizado con DAPI (Azul) usando un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1. Software EZ-C1. Ver. 3.90. La barra de escala representa un tamaño de 15 μ m. En la Fig. 4B se indican los porcentajes del análisis cuantitativo de las imágenes mostradas en la Fig. 4A. La Fig. 4C muestra la citometría de flujo luego de 24 h.p.i. con el rotavirus Wt1-5 adaptado para evaluación de la activación de Caspasa 8 y 3 en células Reh infectadas o no (MOI 1-3) o con el aislamiento inactivado con luz UV (UV/Wt1-5) (MOI 2). El cultivo no fue suplementado con FBS luego de la inoculación con rotavirus. Se realizó la superposición del histograma de las células Reh no inoculadas con el rotavirus (color azul claro) con los histogramas de las células inoculadas con rotavirus Wt1-5. Se indica el porcentaje de células positivas a la derecha y las negativas a la izquierda. Los resultados son representativos de dos diferentes ensayos. En la Fig. 4D el lisado total de células Reh (50 μ g de proteína total/bolsillo) inoculadas con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI 2), fue analizado luego de 24 h.p.i. mediante electroforesis SDS PAGE/Western Blotting usando anticuerpos contra las proteínas BAX, BAX-Activado, Bcl-2, BID, Pro-Caspasa 3, Caspasa 3, Citocromo C, COX-V, Smac/Diablo, VP6 de rotavirus y β -Actina. La línea 1 corresponde al lisado de células Reh no infectadas analizadas a las 0 h.p.i. La línea 2 corresponde al lisado de células Reh no infectadas analizadas a las 24 h.p.i. La línea 3 corresponde al lisado de células Reh inoculadas con el rotavirus previamente inactivado con luz UV (UV/Wt1-5) (MOI 2) analizadas a las 24 h.p.i. y la línea 4 corresponde al lisado de células Reh inoculadas con el rotavirus (MOI 2) analizadas a las 24 h.p.i. En la Fig. 4E se muestra el análisis la densidad relativa de las proteínas para cada variable.

4.5 Inducción de la fragmentación del DNA por la infección con el rotavirus Wt1-5

Para examinar la forma en que la infección por el rotavirus Wt1-5 podría inducir la muerte celular, se infectaron las células Reh en la fase logarítmica de crecimiento (MOI 0.5 - 6) y se cultivaron en ausencia de FBS. Luego de 24 h.p.i. las células fueron fijadas y permeabilizadas para ser teñidas con la prueba TUNEL-FITC (verde) para evidenciar las rupturas en el DNA. Las proteínas estructurales de rotavirus fueron evidenciadas empujando anticuerpos Alexa Fluor 568 (rojo) y el núcleo celular fue teñido con DAPI (azul) (**Fig. 5A**). El ensayo de inmunofluorescencia mostró un incremento significativo de la población celular positiva para la señal fluorescente del ensayo TUNEL, que se relaciona con el aumento en la concentración del inóculo viral en el grupo de células infectadas con rotavirus, al compararlo con las células infectadas con virus inactivado con UV o las células no infectadas, mientras que en las células tratadas con DNasa no infectadas, la proporción de células positivas para TUNEL también se incrementó significativamente (**Fig. 5A**). La cuantificación de células simultáneamente positivas para TUNEL (verde) y para antígenos estructurales de rotavirus (rojo) indicó que su porcentaje se incrementó proporcionalmente a la MOI utilizada, comenzando en un 5% para la MOI de 0.5 hasta un 62% para la MOI de 6, mientras que el porcentaje de células simultáneamente negativas tanto para TUNEL como para rotavirus disminuyó al aumentar la MOI (**Fig. 5B**).

Para corroborar los resultados obtenidos en las *Fig. 5A* y *Fig. 5B*, se extrajo el DNA de células infectadas con rotavirus Wt1-5 (MOI 1 y 6) a las 12 y 24 h.p.i. y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los resultados indicaron que las células inoculadas con rotavirus Wt1-5 presentaron una mayor fragmentación inter y oligonucleosomal del DNA celular que era compatible con un patrón de fragmentación de DNA apoptótico en comparación con los patrones electroforéticos para el DNA de células no infectadas, células infectadas con rotavirus UV inactivado y células tratadas con H₂O₂ usadas como control (**Fig. 5C**). También determinamos la expresión del fragmento de 89 kDa de la proteína PARP-1 (la proteína PARP-1 es escindida por la caspasa 3 generando el fragmento de 89 kDa) usando un anticuerpo específico conjugado con FITC (verde) en células Reh infectadas con rotavirus Wt1-5 luego de 24 h.p.i. Los antígenos estructurales de rotavirus se marcaron con Alexa Fluor 568 (rojo). Los resultados de la inmunofluorescencia indicaron que el fragmento de 89 kDa de la proteína PARP-1 aumentó

su señal fluorescente al aumentar la MOI en comparación con las células control no infectadas o inoculadas con el rotavirus UV inactivado. Sin embargo, la escisión de PARP-1 en células infectadas fue menor que la observada en células control tratadas con DNase I (**Fig. 5D**). El análisis cuantitativo de las imágenes de la *Fig. 5D* mostró que el porcentaje de células que son simultáneamente positivas para el fragmento de 89 kDa de la proteína PARP-1 y para antígenos estructurales de rotavirus aumentó con los valores de MOI, comenzando en un 4% para la MOI de 0.5 hasta un 65% para la MOI de 6, mientras que las células control no infectadas eran en su mayoría negativas para ambas tinciones (83% en promedio) y exclusivamente positivas para PARP-1 en aproximadamente un 17% de la población celular. Las células inoculadas con Wt1-5 inactivado con UV fueron igualmente negativas para ambas tinciones en su mayoría (84% en promedio), mientras que las células tratadas con DNase I fueron predominantemente positivas para el fragmento de PARP-1 (94% en promedio) (**Fig. 5E**). Los datos cuantitativos y sus DE fueron obtenidos de tres ensayos independientes realizados por duplicado. Estos resultados parecen indicar que la infección por el rotavirus Wt1-5 es capaz de inducir la fragmentación inter y oligonucleosomal del DNA, una característica clave de la muerte celular apoptótica.

4.6 Proteínas de superficie celular e infección por el rotavirus Wt1-5

Para evaluar el papel de algunas proteínas celulares localizadas en la membrana citoplasmática de las células Reh en la infección por el rotavirus Wt1-5, mediante ensayos de citometría de flujo se examinó el perfil de expresión de las proteínas celulares HSPs (90, 70, 60 y 40), Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$ usando anticuerpos dirigidos contra estas proteínas, se encontró que todas las proteínas probadas mostraron niveles detectables, pero la expresión de HSPs mostró una gran variación. Los porcentajes de niveles de expresión se distribuyeron en el siguiente orden: Hsp90 (92.3%), PDI (39.6%), Hsc70 (30.9%), integrina $\beta 3$ (29.1%), Hsp70 (28.3%), Hsp60 (10.9%) y Hsp40 (3,2%) (**Fig. 6A**). El valor más alto en la intensidad media de fluorescencia (MFI) se observó para la proteína Hsp70 (6800 AUF), seguido de las proteínas Hsp90 y Hsp60, mientras que los valores más bajos se observaron para las proteínas Hsp40, Hsc70, integrina $\beta 3$ y PDI (**Fig. 6B**).

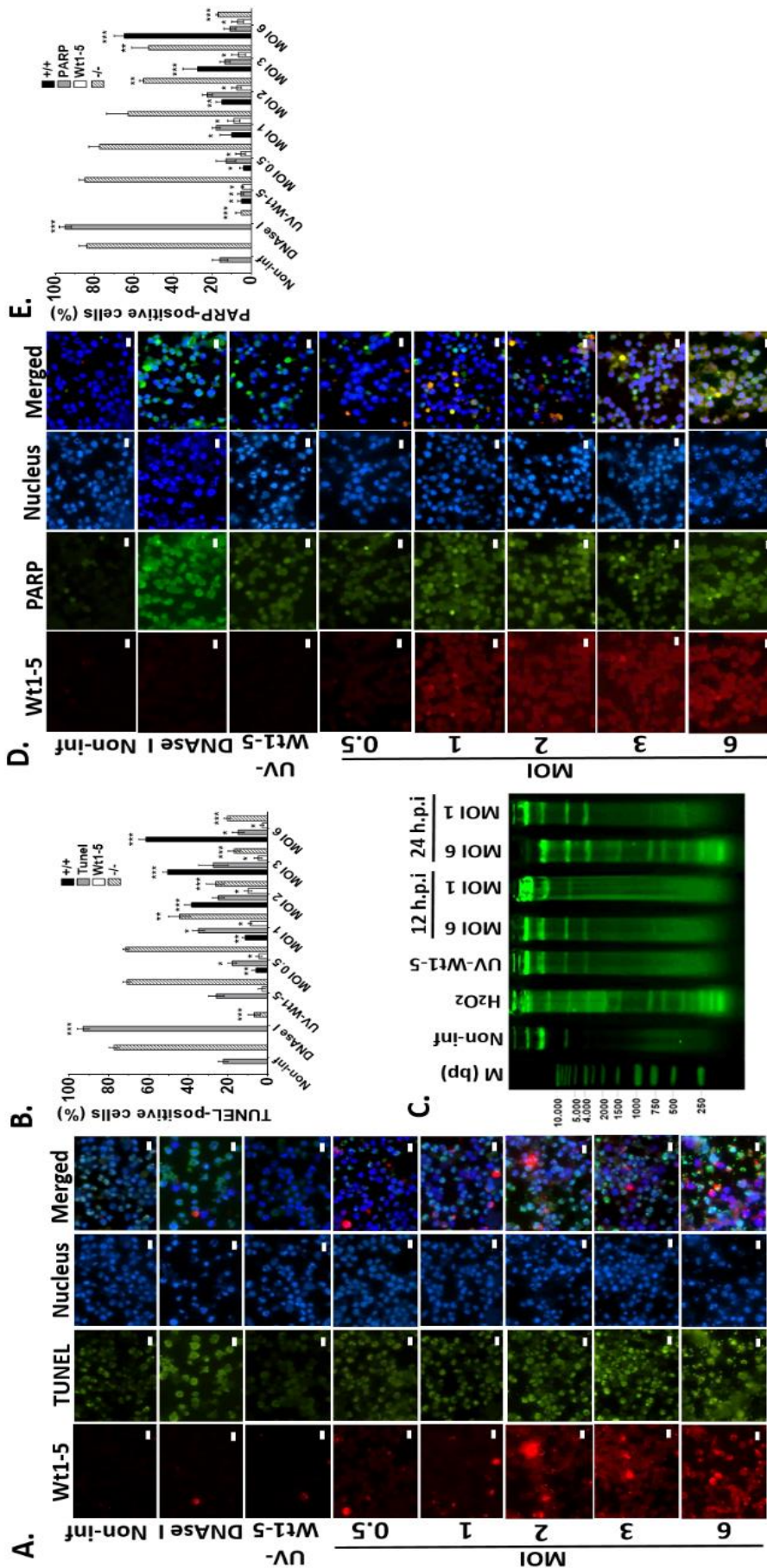


Figura 5. Las células Reh inoculadas con el rotavirus Wt1-5 adaptado presentan fragmentación nuclear.

Las células Reh en fase logarítmica de crecimiento fueron infectadas o no con MOI desde 0.5 hasta 6 del rotavirus Wt1-5 adaptado previamente activado con tripsina y con el aislamiento inactivado con luz UV (UV/Wt1-5) a un MOI de 2, o tratado con DNase I. El cultivo no fue suplementado con FBS. Las células se analizaron a las 24 h.p.i., siendo fijadas con PFA (paraformaldehído) y permeabilizadas. En la **Fig. 5A** se muestran fotografías representativas del ensayo de inmunofluorescencia para el ensayo de TUNEL. Las células Reh fueron co-etiquetadas para TUNEL (FITC, verde), para antígenos estructurales de rotavirus (Alexa 568, rojo) y el núcleo con DAPI (azul). En la **Fig. 5B**, se muestra el análisis cuantitativo de la **Fig.5A** indicando los porcentajes de células Reh TUNEL + y/o que expresan antígenos rotavirales. En la **Fig. 5C** se muestra el ensayo de fragmentación del DNA en gel de Agarosa al 1%. Se visualizó el DNA con SyBR® Safe DNA gel Stain luego de 12 y 24 h.i.p. empleando MOI de 1 y 6. La **Fig. 5D** muestra fotografías representativas del ensayo de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de la proteína PARP clivada luego de 24 h.p.i. Las células Reh fueron co-etiquetadas para PARP clivada (FITC, verde), para antígenos estructurales de rotavirus (Alexa 568, rojo) y el núcleo con DAPI (azul). La **Fig. 5E** muestra el análisis cuantitativo de la **Fig. 5D** indicando el porcentaje de células Reh PARP + y/o células que expresan antígenos rotavirales. Estos resultados son representativos de dos diferentes ensayos, los valores representados corresponden a la mediana. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1. Software EZ-C1. Ver. 3.90. La barra de escala representa un tamaño de 15 μ m.

Para establecer una potencial participación de las proteínas analizadas en el proceso de infección por el rotavirus Wt1-5 en la línea celular Reh, las células fueron pre tratadas con anticuerpos policlonales dirigidos contra las HSPs (90, 70, 60 y 40), Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$ antes de la inoculación del rotavirus Wt1-5 (MOI 2). Posteriormente mediante citometría de flujo se evaluó el porcentaje de células positivas para antígenos estructurales de rotavirus luego de 24 h.p.i. Los resultados indicaron que la incubación previa y separada de anticuerpos dirigidos contra las proteínas de interés logran una reducción en el porcentaje de células positivas para antígenos estructurales virales, aunque esta disminución ocurre en diferentes proporciones para cada tratamiento, se relaciona con su concentración, siendo más evidente cuando los anticuerpos para todas las proteínas probadas se añadieron por separado a 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (**Fig. 6C**). El mayor efecto negativo sobre la acumulación de proteínas estructurales de rotavirus fue causado con el uso de anticuerpos dirigidos contra la proteína Hsp70, mostrando una reducción del 82% en la infección en relación con células no tratadas con anticuerpos (Las células no infectadas se usaron para normalizar el 100% de la infección). Mientras que el uso de anticuerpos dirigidos contra las proteínas Hsp90 o PDI redujo la acumulación de proteínas virales estructurales en un 65% y un 26%, respectivamente (**Fig. 6C**). El pretratamiento de células con anticuerpos a una concentración de 0,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ produjo efectos inhibidores similares a los observados con las concentraciones de anticuerpos de 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Inesperadamente, la mezcla de anticuerpos a una concentración de 0,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ cada uno, no produjo efectos inhibidores aditivos sobre la acumulación de las proteínas estructurales virales (**Fig. 6C**). Los efectos inhibidores del pretratamiento con anticuerpos dirigidos contra las proteínas celulares sobre la acumulación de proteínas estructurales de rotavirus también se estimaron en términos de unidades arbitrarias de MFI (**Fig. 6D**). Esta estimación mostró que una inhibición significativa de la acumulación de proteína estructural viral solo fue causada por el pretratamiento con anticuerpos dirigidos contra las proteínas Hsp90, Hsc70, Hsp70 y la integrina $\beta 3$ cuando se usaron a una concentración de 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Los anticuerpos empleados a una concentración de 0,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$, no redujeron la acumulación de antígenos virales, excepto los dirigidos contra la integrina $\beta 3$, tampoco la mezcla de todos los anticuerpos ensayados (**Fig. 6D**).

Para evaluar el efecto de los anticuerpos contra las proteínas celulares sobre la viabilidad celular, las células Reh se incubaron por separado con anticuerpos dirigidos contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$ y se determinó su

actividad oxidorreductiva mitocondrial luego de 24 h.p.i. usando la prueba de reducción de Resazurina (**Fig. 6E**). La mayoría de los anticuerpos probados en las dos concentraciones empleadas (4.0 o 0.4 $\mu\text{g} / \text{ml}$) no afectaron significativamente la viabilidad celular. Sin embargo, se observó una ligera disminución en la viabilidad celular (entre el 10% al 20%) cuando se realizó el pretratamiento celular con anticuerpos contra las proteínas Hsp90, Hsc70 o PDI a la concentración más alta usada (4 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (**Fig. 6E**). Las células no infectadas se usaron para normalizar el 100% de la viabilidad celular, mientras que las células no infectadas y tratadas con H_2O_2 se usaron como control negativo de la viabilidad celular. Un anticuerpo no relacionado (anti virus Y de la papa) también se usó como control. La imagen que acompaña a las *Fig. 6E* en la parte inferior corresponde a una fotografía representativa del ensayo de Resazurina a las 24 h.p.i.

La viabilidad celular determinada con la prueba de exclusión con Azul de Tripán mostró un perfil similar al encontrado con la prueba de reducción de Resazurina (**Fig. 6F**). Dado que los anticuerpos utilizados reaccionan con las proteínas de la superficie celular, parece plausible sugerir que las proteínas celulares estudiadas están involucradas en la entrada de virus, sin excluir otros efectos intracelulares inducidos por anticuerpos que podrían contribuir al éxito del ciclo de vida del virus.

4.7 Colocalización de las proteínas HSPs, PDI y $\beta 3$ con antígenos estructurales del rotavirus Wt1-5

Dado que se ha informado que el rotavirus usa proteínas de la superficie celular de células MA104, tales como Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$, queríamos determinar si las proteínas estructurales del rotavirus Wt1-5 co-localizan con las proteínas celulares Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$ en las células Reh. Para evaluar esta eventual colocalización, las células Reh se inocularon con rotavirus Wt1-5 (MOI 6) como se indicó anteriormente. Las células infectadas se cosecharon a los 0, 5, 15 y 30 minutos después de la inoculación y luego se fijaron con PFD. Las proteínas celulares indicadas se hicieron reaccionar con los anticuerpos correspondientes y se detectaron con anticuerpos marcados con Alexa Fluor 488 (verde), mientras que las proteínas estructurales del rotavirus Wt1-5 se detectaron con anticuerpos marcados con Alexa Fluor 568 (rojo) y los núcleos se visualizaron con DAPI (azul).

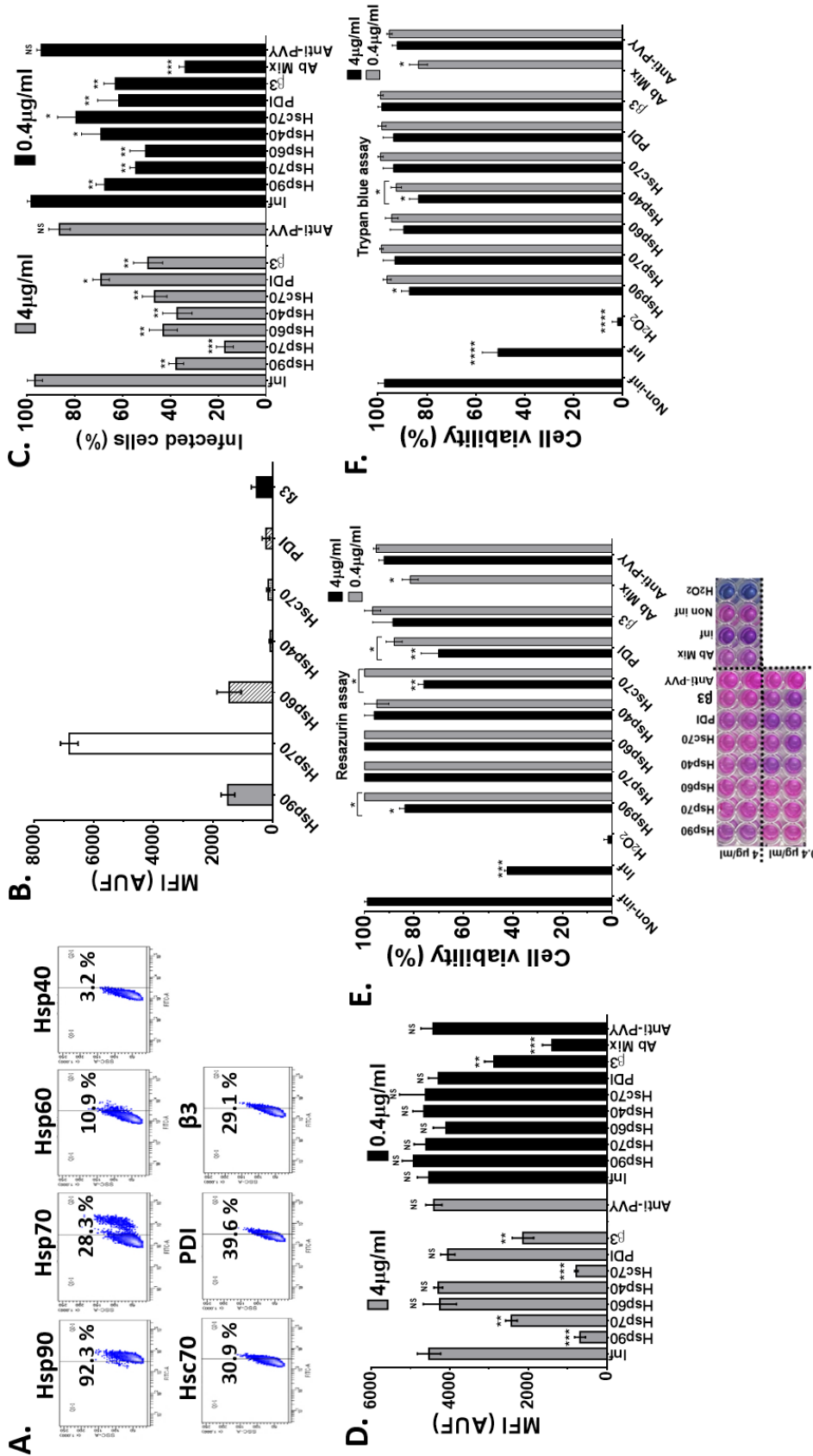


Figura 6. Reducción de la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado al incubar las células Reh con anticuerpos específicos contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsc70, PDI y β3.

Se analizó la expresión de las proteínas en la membrana citoplasmática de células Reh mediante citometría de flujo, empleando anticuerpos policlonales. La Fig. 6A muestra los diagramas de densidad (Dot plots) de citometría de flujo (FITC-A vs side scatter) para cada una de las proteínas analizadas. La Fig. 6B representa la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada una de las proteínas. Se usaron anticuerpos de control de isotipo para ajustar los cuadrantes. Estos resultados son representativos de tres diferentes ensayos. En la Fig. 6C las células Reh en fase logarítmica de crecimiento, fueron incubadas con concentraciones de 4 μg/ml y 0.4 μg/ml de anticuerpos policlonales dirigidos contra las proteínas Hsp90, 70, 60, 40, Hsc70, PDI y β3 durante 1 hora, luego se realizaron lavados y se inocularon las células con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI de 2) previamente activado con tripsina. El cultivo no fue suplementado con FBS. Se colectaron muestras a las 24 h.p.i. siendo fijadas con PFA (paraformaldehído) y permeabilizadas. Se evaluó la presencia de antígenos rotavirales mediante citometría de flujo y se usaron anticuerpos de control de isotipo para ajustar los cuadrantes. Se muestra el porcentaje de expresión de antígenos rotavirales normalizando el % de infección a 100%. En la Fig. 6D se representa la determinación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para la Fig. 6C. En la Fig. 6E, se evaluó la viabilidad celular con Resazurina de las células Reh que fueron previamente incubadas con anticuerpos policlonales contra las proteínas Hsp90, 70, 60, 40, Hsc70, PDI y β3 como se indicó en la Fig. 6C, luego de 24 h.p.i con el rotavirus Wt1-5 adaptado. En la Fig. 6F se representa la determinación de la viabilidad con Azul de Tripiano del mismo grupo celular evaluado en la Fig. 6C. Como controles se emplearon células sin incubación previa con anticuerpos que fueron infectadas o no y células incubadas con una anticuerpo no relacionado anti-PVY (Potato Virus Y) y posteriormente retadas con los aislados virales. Estos resultados son representativos de dos diferentes ensayos.

Las células se analizaron mediante microscopía confocal utilizando un enfoque estadístico global que ejecuta análisis de coeficiente de correlación de intensidad (ICCB) y determina el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de correlación de Mander para los canales verde y rojo (**Fig. 7A - G**). Después de este análisis, se encontró colocalización entre las proteínas estructurales del rotavirus Wt1-5 y las proteínas Hsp90 (**Fig. 7A**), Hsp70 (**Fig. 7B**), Hc70 (**Fig. 7C**) y la integrina $\beta 3$ (**Fig. 7D**) a los 0, 5 y 15 minutos después de inoculación (índice de Pearson de 0.793 a 0.928 y índice de Mander de 0.814 a 0.952). Esta correlación disminuyó después de 30 min después de la inoculación. La colocalización de las proteínas estructurales virales con la proteína PDI mostró índices de correlación no específicos (índice de Pearson de 0,382 a 0,611 e índice de Mander de 0,41 a 0,703) (**Fig. 7E**). No se encontraron índices de correlación significativos entre los antígenos estructurales de rotavirus y las proteínas Hsp60 (**Fig. 7F**) y la proteína Hsp40 (**Fig. 7G**) (índice de Pearson de 0.329 a 0.462 y índice de Mander de 0.406 a 0.517).

4.8 Descripción de la cohorte de pacientes en edad pediátrica diagnosticados con leucemia linfoblástica LLA-B donantes de las muestras de sangre periférica para la recuperación de linfoblastos.

Se colectaron muestras de sangre periférica (SP) de 34 pacientes en edad pediátrica (0-18 años) con diagnóstico inmunofenotípico confirmado de leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B) realizado en aspirados de medula ósea (AMO), que fueron atendidos en el servicio de Oncohematología pediátrica de la Fundación HOMI durante el periodo de tiempo comprendido entre 15 de agosto de 2013 a 15 de agosto de 2015. Se recolectaron muestras provenientes de pacientes con diagnóstico inicial de leucemia linfoblástica aguda de precursores B que no habían iniciado tratamiento al momento de la recolección. Fueron incluidas muestras de pacientes con riesgo bajo, intermedio (estándar) o alto al momento del diagnóstico, que hayan tenido recuentos de leucocitos en sangre periférica $> 5000 \text{ cel/mm}^3$, con porcentajes de $> 20\%$ de blastos reportados en el extendido de sangre periférica (SP), quienes autorizaron el uso de las muestras de SP para investigación del rotavirus Wt1-5 como potencial virus oncolítico. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Fundación HOMI y de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia antes de la recolección de muestras y de la revisión de las bases de datos, conservando el principio de privacidad y confidencialidad.

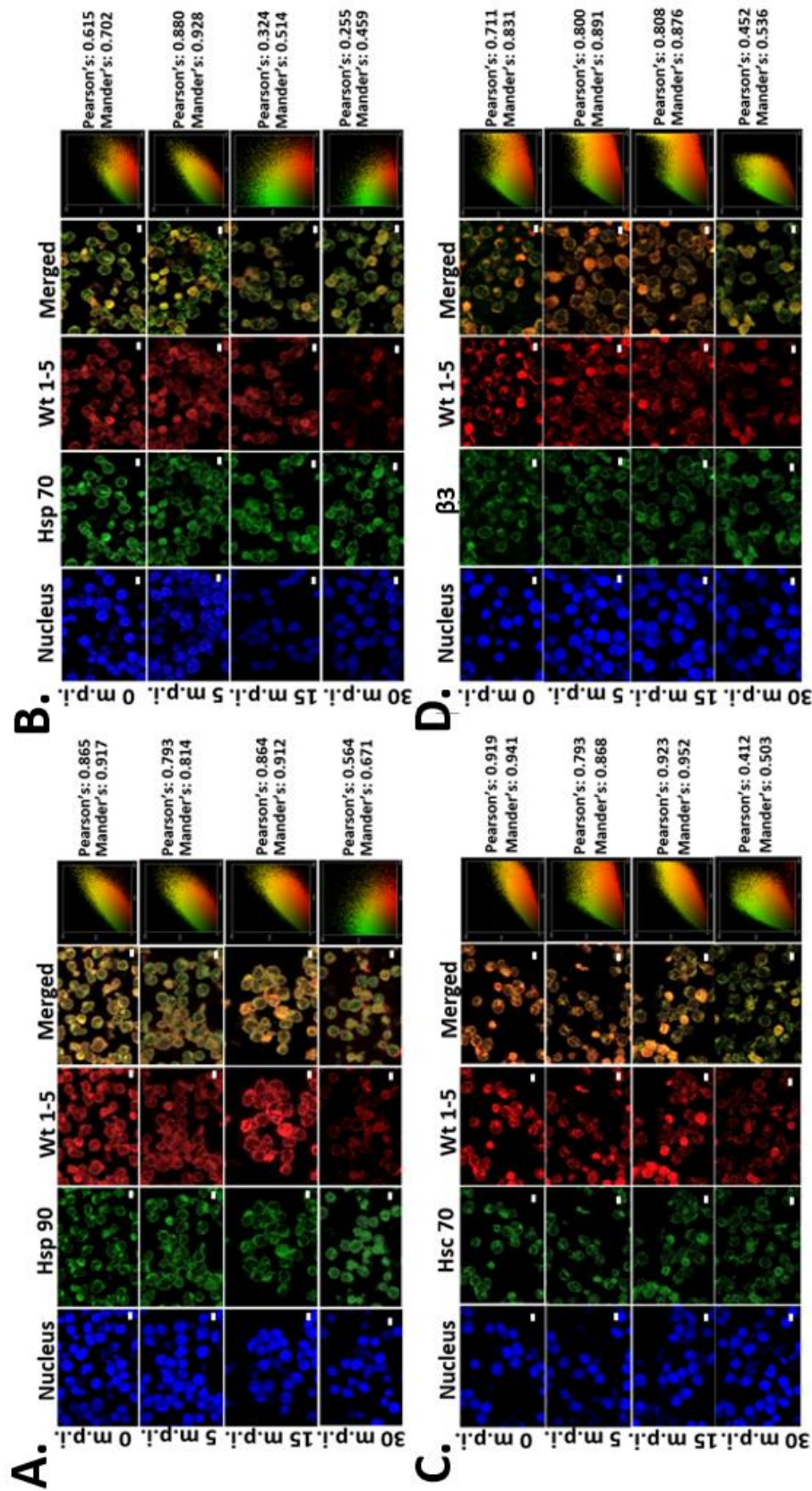
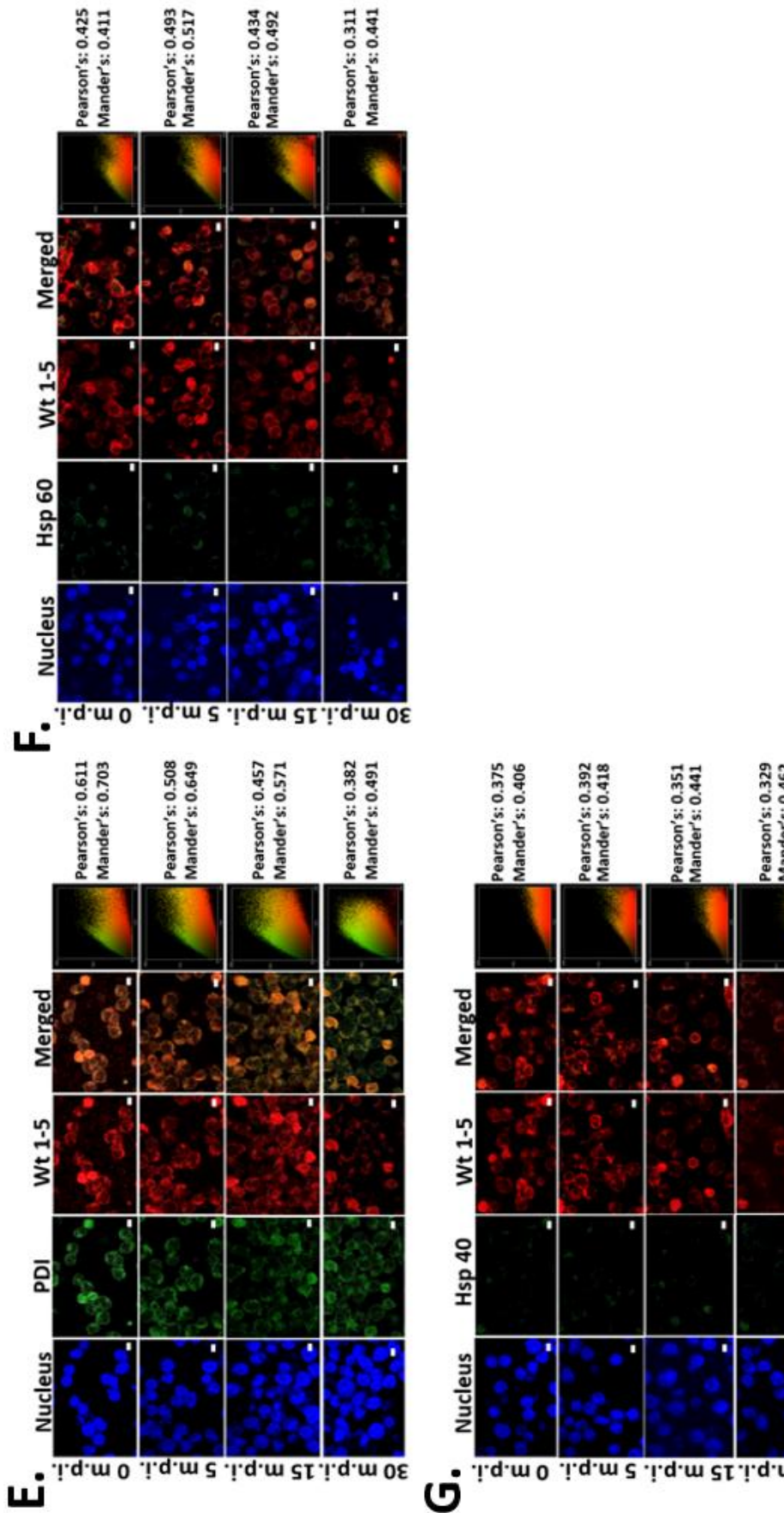


Figura 7. Colocalización de las proteínas celulares Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI y $\beta 3$ y proteínas estructurales del rotavirus Wt1-5 adaptado.

Se muestran imágenes representativas de la microscopía confocal de células Reh previamente incubadas a 4°C durante 15 minutos, posterior a este periodo de incubación las células fueron inoculadas con una MOI de 3 del rotavirus Wt1-5 adaptado previamente activado con tripsina. Las células se fijaron con PFD (paraformaldehído al 4%) a los 0, 5, 15 y 30 minutos post infección (m.p.i.). Las células Reh fueron coetiquetadas para la detección de las proteínas de interés Hsp90 (Fig. 7A), Hsp70 (Fig. 7B), Hsc70 (Fig. 7C), $\beta 3$ (Fig. 7D), PDI (Fig. 7E), Hsp60 (Fig. 7F) y Hsp40 (Fig. 7G) con anticuerpos-Alexa 488 (verde), para antígenos estructurales de rotavirus con anticuerpos-Alexa 568 (rojo) y el núcleo con DAPI (azul). Se realizó una aproximación estadística de colocalización basada en coeficientes de correlación de intensidades (ICCB) sobre la imagen completa, mediante la medición de los coeficientes de Pearson y Mander's para los valores de intensidad de fluorescencia de pixeles en gris, entre los canales verde y rojo. Los resultados de los coeficientes son mostrados en la parte derecha de las fotografías. Los resultados en la co-localización se reportaron así: no colocalización, muy débil, moderada, fuerte y muy fuerte. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1. Software EZ-C1. Ver. Gold 3.90. Con el Objetivo PlanApo. 100x / NA1.40 / WD0.13 PFS de aceite. La barra de escala representa un tamaño de 10 μm . El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ 1.44 [Java 1.6.0.20](http://Java.1.6.0.20) de 32-bit. Estos resultados son representativos de dos diferentes ensayos.



Se muestran imágenes representativas de la microscopía confocal de células Reh previamente incubadas a 4°C durante 15 minutos, posterior a este periodo de incubación las células fueron inoculadas con una MOI de 3 del rotavirus Wt1-5 adaptado previamente activado con tripsina. Las células se fijaron con PFD (parafomaldehído al 4%) a los 0, 5, 15 y 30 minutos post infección (m.p.i.). Las células Reh fueron coetiquetadas para la detección de las proteínas de interés Hsp90 (Fig. 7A), Hsp70 (Fig. 7B), Hsc70 (Fig. 7C), $\beta 3$ (Fig. 7D), PDI (Fig. 7E), Hsp60 (Fig. 7F) y Hsp40 (Fig. 7G) con anticuerpos-Alexa 488 (verde), para antígenos estructurales de rotavirus con anticuerpos-Alexa 568 (rojo) y el núcleo con DAPI (azul). Se realizó una aproximación estadística de colocalización basada en coeficientes de correlación de intensidad (ICCB) sobre la imagen completa, mediante la medición de los coeficientes de Pearson y Mander's para los valores de intensidad de fluorescencia de píxeles en grís, entre los canales verde y rojo. Los resultados de los coeficientes son mostrados en la parte derecha de las fotografías. Los resultados en la co-localización se reportaron así: no colocalización, muy débil, moderada, fuerte y muy fuerte. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio invertido de escaneo láser confocal Nikon C1. Software EZ-C1. Ver. Gold 3.90. Con el Objetivo PlanApo. 100x / NA1.40 / WD0.13 PFS de aceite. La barra de escala representa un tamaño de 10 μm . El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ 1.44 [Java 1.6.0_20](https://www.java.com/en/download/whatsnew.jsp) de 32-bit. Estos resultados son representativos de dos diferentes ensayos.

Se obtuvieron datos clínicos de interés tales como la edad, el sexo, el recuento de leucocitos, el % de blastos en SP, el diagnóstico de inmunofenotipo (B común, Pro B, Pre B o Mixta B/Mieloide), el reporte de los estudios de cariotipo (normal, monosomía, hiperploidía, o no realizado) y de citogenética (translocaciones t 4:11, t 9:22 y t 12:22) y finalmente el desenlace clínico resultante (remisión, recaída o muerte) durante el periodo de seguimiento (**Tabla 11**).

Se recolectaron un total real de 48 muestras, de las cuales 34 cumplieron los criterios de inclusión y exclusión del estudio, las cuales en su mayoría tuvieron un diagnóstico de inmunofenotipo de LLA-B común (88.2% n=30), seguidas por la LLA-Pro B (5.9% n=2), LLA-Pre B (2.9 % n=1) y la LLA mixta B/Mieloide (2.9% n=1) (**Fig. 8A**). En la (**Fig. 8B**) se indica el número de muestras obtenidas de acuerdo al porcentaje de linfoblastos hallados en el extendido de sangre periférica, visualizados mediante la tinción de Wright. La mayor parte de las muestras obtenidas tuvieron > del 80% de blastos en SP (52.9% n= 18), seguidas de los rangos entre el 60-79% (26.4% n= 8), 40-59% (14.7% n= 5), 20-39% (5.8% n= 2) y 0-19 % (2.9% n= 1) (**Fig. 8B**). Los hallazgos del cariotipo realizado a los linfoblastos, son descritos en la (**Fig. 8C**) encontrando un cariotipo normal en un 38.2% (n=13), monosomía en un 8.8% (n=3), hiperploidía en un 11.7% (n=4), no realizado en un 17.6% (n=6) y no se encontraron metafases en un 23.5% (n=8). El resultado del análisis para tres translocaciones analizadas (t 4:11, t 9:22, t 12:22), se reportó como negativo, positivo o no reportado (**Fig. 8D**). La mayoría de las muestras fueron negativas para las translocaciones estudiadas (entre el 61.7% al 76.4%). Se encontró positividad para la t 9:22 en un 20.5% (n=7) y para la t 12:22 (n=8) (**Fig. 8D**). La distribución etaria de las muestras se encontró en un rango entre los 0-16 años, con un pico entre los 5 y 6 años (**Fig. 8E**). Se encontró una distribución equitativa entre las muestra provenientes de sexo femenino o masculino con un n=17 para cada grupo (**Fig. 8F**).

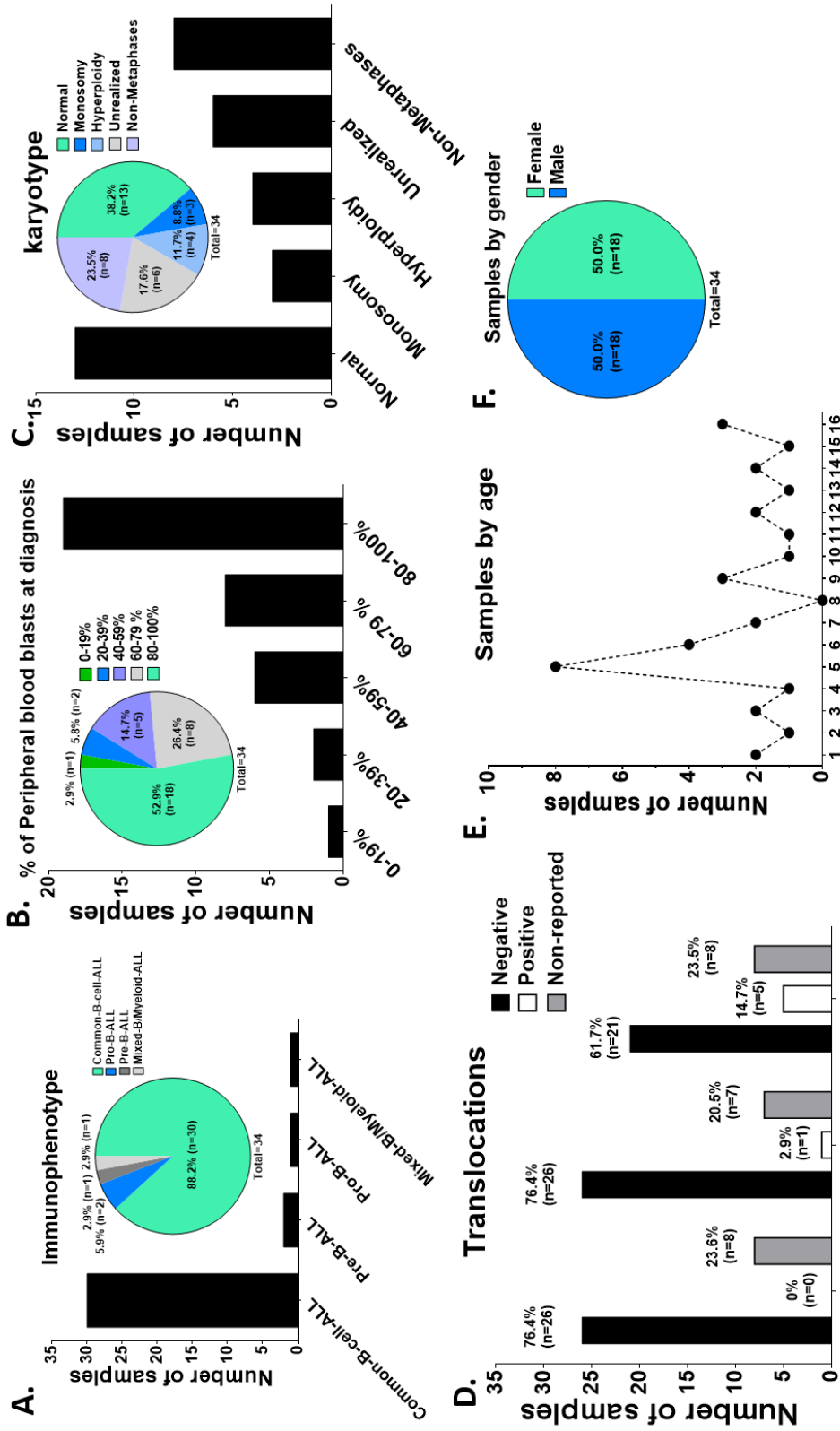


Figura 9. Descripción de las principales variables clínicas de la población de muestras de linfoblastos obtenidos de sangre periférica de pacientes de edad pediátrica diagnosticados con leucemia linfoblástica LLA-B.

Los linfoblastos LLA-B fueron recolectados, transportados y separados mediante centrifugación empleando tubos CPT-BD™ de 8 ml con heparina sódica. La Fig. 8A describe el número de muestras obtenidas de acuerdo al inmunofenotipo determinado mediante citometría de flujo (B común, Pre B, pre B, Mixta B/Myeloide). La Fig. 8B indica el número de muestras obtenidas de acuerdo al porcentaje de linfoblastos hallados en el extendido de sangre periférica, visualizados mediante la tinción de Wright. La Fig. 8C representa los hallazgos del cariotipo realizado a los linfoblastos, se anota como normal, monosomía, hiperploideía, no realizado o no metafases encontradas. La Fig. 8D muestra el resultado del análisis para tres translocaciones analizadas (t 4;11, t 9;22, t 12;22), el resultado se describe como negativo, positivo o no reportado. La Fig. 8E señala la distribución de las muestras obtenidas por edad desde 1-16 años. La Fig. 8F indica la distribución de las muestras de acuerdo al sexo de los pacientes (Femenino o Masculino). El número total de muestras obtenidas fue 34. Las muestras fueron recolectadas asincrónicamente bajo la firma de consentimiento informado de los padres.

Tabla 11. Datos clínicos de las muestras de linfoblastos LLA-B

N°	Age (years)	Gender	Phenotype	PB-blast (%)	t 4:11	t 12:21	t 9:22	Karyotype	Risk	Death/Relapse
1	6	F	Common-B-cell-ALL	93.05%	-	-	-	Not done	Intermediate	No
2	14	F	Common-B-cell-ALL	72.52%	-	-	-	Non-metaphases	Intermediate	No
3	13	F	Common-B-cell-ALL	71.72%	-	-	-	46 XX. Normal.	Intermediate	No
4	12	F	Common-B-cell-ALL	73.42%	-	Not done	+	Non-metaphases	High	Death
5	5	F	Common-B-cell-ALL	41.99%	-	-	-	46 XX. Normal	Intermediate	No
6	14	F	Pre-B-ALL	75.51%	-	-	-	46 XX. Normal	Intermediate	No
7	16	M	Common-B-cell-ALL	65.90%	-	Not done	-	Non-metaphases	Intermediate	No
8	9	M	Common-B-cell-ALL	80.15%	Not done	Not done	Not done	47 XY. + 21. Sd Down.	High	Relapse
9	7	F	Pre-B-ALL	84.30%	Not done	Not done	Not done	Not done	Intermediate	No
10	5	M	Common-B-cell-ALL	67.68%	Not done	Not done	-	Not done	High	Relapse
11	6	F	Common-B-cell-ALL	50.68%	-	-	-	Non-metaphases.	Intermediate	No
12	3	M	Common-B-cell-ALL	81.77%	Not done	Not done	Not done	46 XY. Hyperploidy. Trisomies 4, 12,15, 20,22 in one image	High	No
13	14	M	Pro-B-ALL	94.60%	-	-	-	46 XY. Normal	High	Relapse
14	10	M	Common-B-cell-ALL	73.32%	-	-	-	46 XY. Normal	Intermediate	No
15	0.7	F	Mixed- B/Myeloid-ALL	93.72%	-	-	-	46 XX. t(11q+;17q-)	High	Death
16	5	M	Common-B-cell-ALL	81.50%	Not done	Not done	Not done	47 XY. + 21. Sd Down.	Intermediate	Death
17	11	F	Common-B-cell-ALL	88.76%	-	+	-	47 XX. Double translocation t(9p+;22q-). Trisomy 21 with philadelphia chromosome. Monosomy 8 t(1q-;12q+)	Intermediate	No
18	5	F	Common-B-cell-ALL	84%	-	-	-	46 XX. Normal	High	No
19	4	F	Common-B-cell-ALL	89.83%	-	+	-	Non-metaphases	High	No
20	9	M	Common-B-cell-ALL	54.10%	-	-	-	Non-metaphases	Intermediate	No
21	3	M	Common-B-cell-ALL	86.94%	-	-	-	Not done	Intermediate	No
22	5	F	Common-B-cell-ALL	94%	-	-	-	46 XX. Normal	High	No
23	7	M	Common-B-cell-ALL	44.34%	-	-	-	46 XY. Normal	Intermediate	No
24	6	M	Common-B-cell-ALL	97.73%	Not done	Not done	Not done	Not done	High	No
25	12	F	Common-B-cell-ALL	94.41%	-	-	-	46 XX. Normal	Intermediate	No
26	1	M	Common-B-cell-ALL	85.45%	-	-	-	Non-metaphases	Intermediate	No
27	5	M	Common-B-cell-ALL	86.87%	Not done	Not done	Not done	46 XY. Monosomy 21 in two images.	High	No
28	12	F	Common-B-cell-ALL	84.06%	Not done	Not done	Not done	Non-metaphases	High	No
29	9	F	Common-B-cell-ALL	60.79%	-	-	-	46 XX. Hyperploidy, 51 chromosomes. Predominance of chromosomes 12 and 21.	High	No
30	16	M	Common-B-cell-ALL	88.93%	-	+	-	46 XY. Normal	High	Relapse
31	2	M	Common-B-cell-ALL	83.62%	-	-	-	46 XY. Normal	High	No
32	6	M	Common-B-cell-ALL	39.98%	-	+	-	45 XY-17(1), 45 XY-19(2), 45 XY-21(1), 45 XY(15).	High	No
33	5	F	Pro-B-ALL	48.60%	-	Not done	-	Non-metaphases.	Standard	No
34	5	F	Common-B-cell-ALL	63.81%	-	-	-	46 XX. Normal	Intermediate	No

Tabla de datos de las muestras de linfoblastos obtenidos de pacientes diagnosticados con LLA-B que no habían iniciado tratamiento al momento de la recolección. Los datos mostrados son la edad, el sexo, diagnóstico fenotípico mediante citometría de flujo, porcentaje de linfoblastos en sangre periférica al diagnóstico, análisis citogenético para translocaciones t 4:11, t 12:21 o t 9:22, cariotipo, el riesgo al momento del diagnóstico y si presentaron recaída o muerte durante los dos primeros años tras el diagnóstico.

ALL: acute lymphoblastic leukemia, PB-blast: peripheral blood blasts.

4.9 Evaluación de la susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado en linfoblastos LLA-B y en las PBMCs del grupo control sano.

Dada la heterogeneidad poblacional de los linfoblastos LLA-B obtenidos de SP, buscamos analizar si son susceptibles a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado. Para esto los linfoblastos LLA-B de 8 pacientes fueron recolectados, transportados y separados a la mayor brevedad mediante centrifugación empleando tubos CPT-BD™ de 8 ml con heparina sódica (la recolección y análisis se desarrollaron individualmente de forma asincrónica). Luego de su recuperación, los linfoblastos LLA-B fueron inmediatamente dispuestos en medio de cultivo RPMI sin FBS e inoculados o no con el aislamiento de rotavirus Wt1-5 empleando multiplicidades de infección (MOI) desde 0.5 hasta 6. Luego de 24 h.p.i. los linfoblastos fueron analizados mediante citometría de flujo para evaluar la presencia de proteínas estructurales de rotavirus (VP). Se encontró una proporción creciente de células positivas a VP de rotavirus con el aumento de la MOI (**Fig. 9A**), con un máximo entre 58-54 % para la MOI de 6. A partir de la MOI de 1 se hallaron diferencias significativas en la

expresión de VP al compararlos con los grupos control de linfoblastos inoculados con el virus inactivado con luz UV o células no infectadas (**Fig. 9A**). Interesantemente este mismo análisis realizado en 10 muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mostró un porcentaje máximo del 10% de positividad para VP en la MOI más alta (**Fig. 9E**). El análisis de la intensidad media de fluorescencia (MFI) del ensayo de la **Fig. 9A**, mostró un incremento en la MFI relacionado con la MOI, siendo igualmente mayor para la MOI de 6, sin embargo las MOI de 0.5, 1 y 2 tuvieron valores de MFI similares (**Fig. 9B**), mientras que los valores de MFI de los ensayos de la **Fig. 9E** fueron considerablemente menores y constantes en las PBMCs independientemente de la MOI empleada (**Fig. 9F**).

Se examinó la acumulación de VP rotavirales en 8 muestras de blastos LLA-B a las 6, 12, 18 y 24 h.p.i. en células inoculadas o no con una MOI de 2 del rotavirus Wt1-5. El análisis de las VP mediante citometría de flujo mostró una acumulación de antígenos rotavirales desde las 6 h.p.i. (4%), aunque no se obtuvieron diferencias significativas con el grupo control. Estas diferencias se evidenciaron desde las 12 h.p.i. (10% en promedio), y un máximo a las 24 h.p.i. (22% en promedio) (**Fig. 9C**). Por otro lado, los resultados de las PBMCs infectadas con rotavirus en condiciones similares, reportaron que luego de 18 y 24 h.p.i. alrededor de un 8% y un 10% de células fueron respectivamente positivas para VP obteniendo diferencias significativas con los grupos control. Sin embargo al comparar estos resultados con los obtenidos para los linfoblastos se denotan valores mucho menores (**Fig. 9G**). Equivalentemente el análisis de la MFI del ensayo de la **Fig. 9C** reportó una tendencia similar en relación a la acumulación de la señal fluorescente asociada a la MOI usada (**Fig. 9D**), mientras que este mismo análisis realizado a las PBMCs de la **Fig. 9G** reveló que la MFI no cambió entre las distintas MOI y que sus valores son comparativamente inferiores a los obtenidos en los ensayos con los linfoblastos LLA-B (**Fig. 9H**). Se muestran fotografías representativas de los ensayos de inmunofluorescencia de linfoblastos LLA-B (**Fig. 9I**) y de PBMCs (**Fig. 9J**) infectados o no con rotavirus Wt1-5 (MOI 2) luego de 24 h.p.i. que fueron co-etiquetados para examinar la presencia de VP rotavirales (FITC, verde) y el núcleo fue marcado con DAPI (azul). Como complemento se muestra la superposición de imágenes (Merged) y la *Microscopía* de Contraste Diferencial interferencial (DIC). El análisis cualitativo de las imágenes mostró la presencia de antígenos VP de rotavirus en el citoplasma de los linfoblastos LLA- B (**Fig. 9I**) pero no en las PBMCs (**Fig. 9J**).

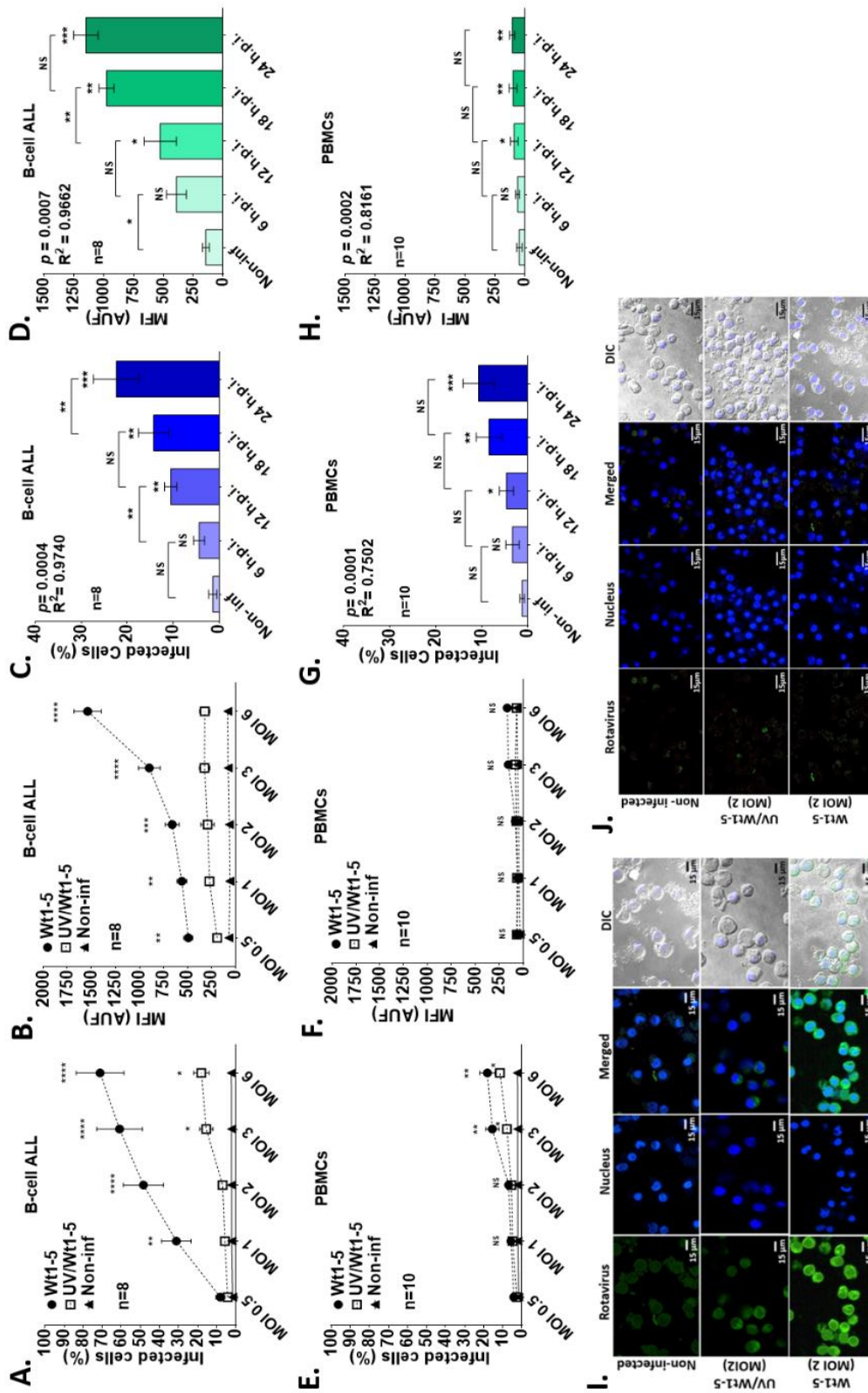


Figura 10. Evaluación de la susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado en linfoblastos LLA-B obtenidos de pacientes con diagnóstico confirmado de LLA-B que no han iniciado tratamiento y en las PBMCs del grupo control.

Los linfoblastos LLA-B y las PBMCs recuperados y purificados se procesaron inmediatamente, siendo inoculados o no con el rotavirus adaptado Wt1-5 previamente activado con tripsina (MOI=0.5-6), sin suplemento de FBS. Como control se empleó rotavirus previamente inactivado con luz UV (UV/Wt1-5). Se colectaron muestras a las 24 h.p.i. siendo fijadas con PFA (paraformaldehído). Posteriormente se analizó la expresión de antígenos estructurales rotavirales mediante citometría de flujo. En la Fig. 9A, se muestra el porcentaje de infección en los linfoblastos LLA-B y en la Fig. 9E para las PBMCs. Las Figs. 9B (LLA-B) y Fig. 9F (PBMCs) representan la intensidad media de fluorescencia (MFI) para antígenos rotavirales en cada una de las variables analizadas en las Fig. 9C y Fig. 9G respectivamente. En las Fig. 9C (LLA-B) y Fig. 9E (PBMCs) se muestran los porcentajes de células que fueron positivas en la citometría de flujo para antígenos rotavirales estructurales entre las 6-24 h.p.i. Las células fueron inoculadas o no con MOI de 2. Las Figs. 9D (LLA-B) y Fig. 9H (PBMCs), representan la intensidad media de fluorescencia (IMF) para antígenos rotavirales en cada una de las variables analizadas en las Fig. 9C y Fig. 9G respectivamente. El número de muestras analizadas en los ensayos con linfoblastos fue n= 8 y en las PBMCs fue n= 8 y en las Fig. 9I (LLA-B) y Fig. 9J (PBMCs) se muestran fotografías representativas del ensayo de inmunofluorescencia para antígenos rotavirales estructurales luego de 24 h.p.i. (MOI2). Las muestras fueron co-etiquetadas para proteínas estructurales de rotavirus (FITC, verde) y el núcleo con DAPI (azul) y se muestra la Microscopía de Contraste Diferencial (Differential interference contrast "DIC" microscopy). Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio láser confocal Nikon C1. Software EZ-C1. Ver. 3.90. La barra de escala representa un tamaño de 15 μ m. Para los ensayos de citometría de flujo se usaron anticuerpos de control de isotipo para ajustar los cuadrantes. Los valores de todos los ensayos representados corresponden a la mediana de dos experimentos independientes por condición.

4.10 Efectos de la inoculación con el rotavirus Wt1-5 sobre la viabilidad celular y la permeabilidad de la membrana celular

Con el fin de establecer los cambios en la viabilidad de los linfoblastos LLA-B y las PBMCs inoculados con el rotavirus Wt1-5 (MOI 0.5-6) luego de 24 h.p.i. en ausencia de FBS, se evaluó la integridad de la membrana citoplasmática mediante el ensayo de exclusión con Azul de Tripán en 8 muestras LLA-B y en 10 muestras del grupo control PBMCs. El ensayo mostró que en los linfoblastos inoculados con rotavirus la permeabilidad al Azul de Tripán aumenta progresivamente con el incremento en la MOI empleada, partiendo de una reducción en la viabilidad celular del 15% para la MOI de 1 hasta un 68% para la MOI de 6 (**Fig. 10A**). De otra parte, en las PBMCs inoculadas con rotavirus no se incrementó significativamente la permeabilidad al Azul de Tripán en comparación con los grupos control de células no infectadas y células inoculadas con rotavirus UV inactivado, observando una reducción máxima del 10% en la viabilidad celular (**Fig. 10D**). Para ambos grupos celulares el tratamiento con 1 μ M de H₂O₂ comprometió completamente la integridad de la membrana permitiendo la incorporación de la tinción.

Se examinaron las consecuencias de la infección sobre la actividad oxidorreductiva mitocondrial mediante el ensayo de Resazurina en linfoblastos LLA-B (n=8) y PBMCs (n=10) inoculadas o no con rotavirus Wt1-5 (MOI 0.5 – 6) en ausencia de FBS a las 24 h.p.i. En los linfoblastos los resultados mostraron una disminución en la actividad oxidorreductiva a partir de la MOI de 1 (12%), encontrando una mayor reducción en la MOI de 6 (70%). Los linfoblastos no infectados o los inoculados con rotavirus UV inactivado mantuvieron su actividad oxidorreductiva. Para las células tratadas con H₂O₂ la actividad se redujo al 0% (**Fig. 10B**). No se encontraron cambios significativos en la actividad oxidorreductiva en el grupo de PBMCs control, excepto en las MOI de 3 y 6 donde se halló una reducción del 5 % y del 18 % respectivamente (**Fig. 10E**).

Con el propósito de confirmar los hallazgos encontrados en los anteriores ensayos, se analizó el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) con el reactivo DiOC6 (3) y la permeabilidad de la membrana celular usando 7-AAD tanto en los linfoblastos LLA-B (**Fig. 10C**), como en las PBMCs (**Fig. 10F**) inoculadas o no con rotavirus Wt1-5 (MOI 2) cultivadas sin FBS y analizadas luego 24 h.p.i. Los diagramas de puntos (Dot plots) de la citometría de flujo representan la combinación de ambas tinciones. Las células que

mantienen tanto la integridad de la membrana citoplasmática así como el $\Delta\Psi_m$ (viables) están en el cuadrante inferior derecho. El cuadrante superior derecho representa las células que mantienen el $\Delta\Psi_m$ pero han perdido la integridad de la membrana citoplasmática (células necróticas). El cuadrante inferior izquierdo representa las células que mantienen la integridad de la membrana citoplasmática pero han perdido el $\Delta\Psi_m$ (células en apoptosis temprana) y finalmente, el cuadrante superior izquierdo representa las células que han perdido tanto la integridad de la membrana citoplasmática como el $\Delta\Psi_m$ (células en apoptosis tardía). Los ensayos indicaron que los linfoblastos control no infectados mantuvieron su $\Delta\Psi_m$ en un 68.3 % mientras que un 20.9% lo pierde y un 2.8 % presenta cambios en la permeabilidad de la membrana. Se encontraron resultados similares para las células inoculadas con virus inactivado por UV (MOI 2). En los linfoblastos tratados con H_2O_2 los porcentajes de células se encontró un 44.3% de células son positivas para 7-AAD y negativas a DiOC6, indicando un compromiso a nivel de la membrana citoplasmática y en el $\Delta\Psi_m$. La marcación permitió encontrar un 17.3 % de células positivas a 7-AAD y negativas a DiOC6, un 20.6% de negatividad para DiOC6, un 9.0% de positividad para 7-AAD y un 52.8% de positividad a DiOC-6 (**Fig. 10C**). Comparativamente, los resultados obtenidos en las células PBMCs, indicaron que el 68.3% de las células control no infectadas mantuvieron su $\Delta\Psi_m$, con un 31.2 % de células negativas a DiOC6 y un 0.0 % de células positivas para 7-AAD. Tanto las células PBMCs inoculadas con rotavirus activo o UV inactivado mantuvieron un comportamiento bastante similar en la marcación al encontrado en el grupo control de células no infectadas (**Fig. 3D**) indicando un efecto citotóxico preferencial por parte del rotavirus Wt1-5 adaptado sobre los linfoblastos LLA-B. Los resultados mostrados son representativos de una muestra por cada grupo examinado (LLA-B y PBMCs). Todos los ensayos representan la desviación estándar (SD) de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

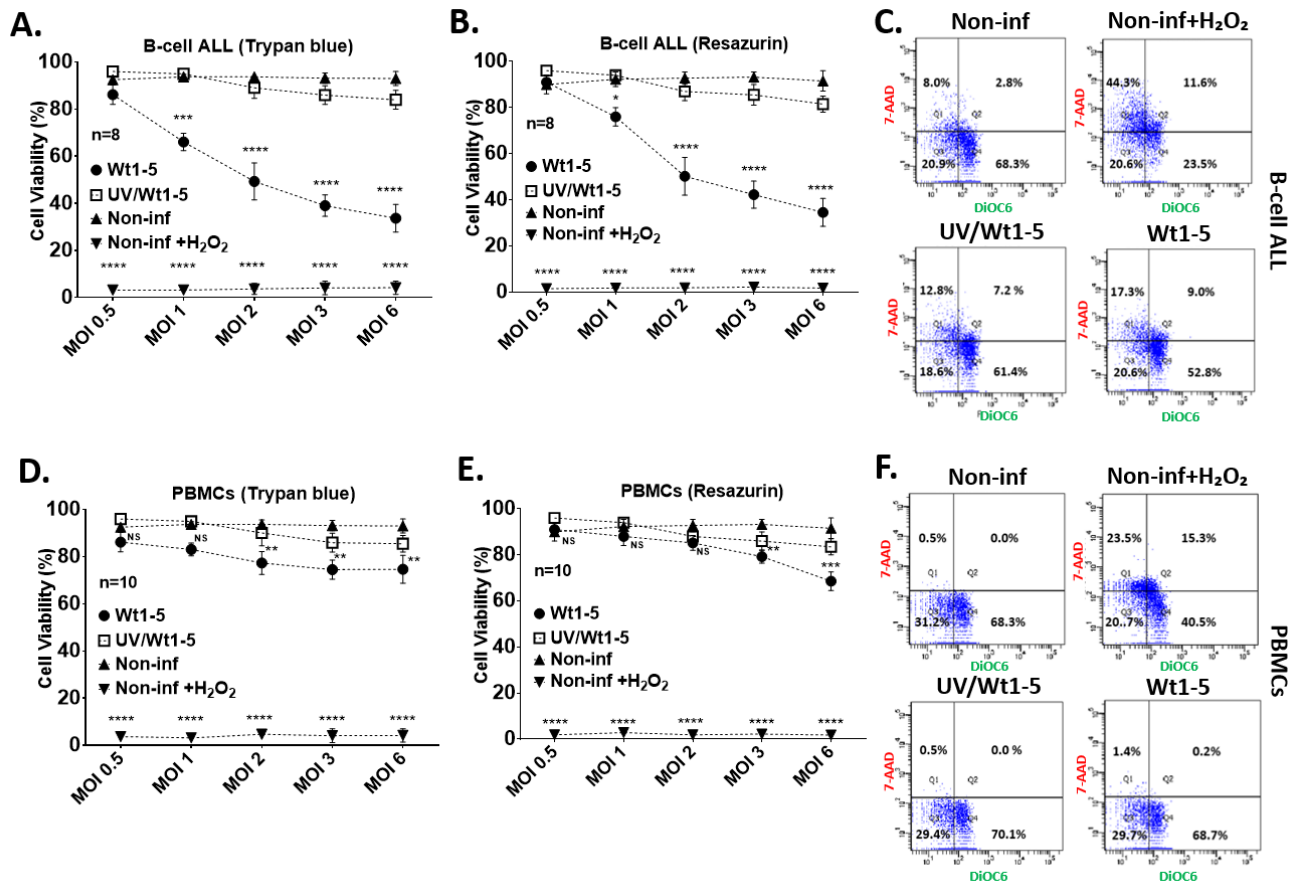


Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular luego de la inoculación con el rotavirus Wt1-5 adaptado en linfoblastos LLA-B y en las PBMCs del grupo control sano luego de 24.h.p.i.

La Fig. 10A (LLA-B) y la Fig. 10D (PBMCs) muestran el análisis de la viabilidad celular con el test de exclusión de azul de tripan para el ensayo de las Fig. 9A y Fig. 9E respectivamente. En las Fig. 10B (LLA-B) y Fig. 10E (PBMCs) se determinó el estado oxidoreductor usando el ensayo de viabilidad celular con Resazurina para los ensayos de las Fig. 9A y Fig. 9E respectivamente. Los linfoblastos LLA-B y las PBMCs recuperadas y purificadas se procesaron inmediatamente, siendo inoculadas o no con el rotavirus adaptado Wt1-5 previamente activado con tripsina, sin suplemento de FBS. Como control se empleó rotavirus previamente inactivado con luz UV (UV/Wt1-5) (MOI 2). El número de muestras analizadas en los ensayos con linfoblastos fue n= 8 y en las PBMCs fue n=10. Las Fig. 10C (LLA-B) y Fig. 10F (PBMCs) muestran el análisis mediante citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) evaluado con DiOC6(3) y de la permeabilidad de la membrana citoplasmática evaluado con 7-AAD infectadas o no con el rotavirus adaptado Wt-1-5 y analizadas luego de 24 h.p.i. para un paciente representativo en cada caso (LLA-B= Pte 24 y PBMCs Pte 32). Las células viables (no- apoptóticas y no necróticas) están presentes en el cuadrante inferior derecho. El cuadrante superior derecho representa las células Necróticas. El cuadrante inferior izquierdo representa células en apoptosis temprana. El cuadrante superior izquierdo representa las células en apoptosis tardía. Se indican los porcentajes de cada cuadrante. Los resultados son representativos de dos diferentes ensayos. Se usaron anticuerpos de control de isotipo para ajustar los cuadrantes. Los valores de todos los ensayos representados corresponden a la mediana de dos experimentos independientes por condición.

4.11 Análisis de infectividad del rotavirus Wt1-5 adaptado sobre linfoblastos LLA-B y en PBMCs

Para establecer comparativamente un efecto selectivo de la capacidad infecciosa del rotavirus Wt1-5 adaptado sobre células tumorales, los Linfoblastos LLA-B (n=34) y las PBMCs (n=34) fueron inoculadas o no con rotavirus (MOI 1 y 2) y cultivados sin FBS.

Luego de 24 h.p.i. se analizó la expresión de VP rotavirales mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que los linfoblastos inoculados con rotavirus Wt1-5 presentaron una mayor proporción promedio de células positivas a antígenos de rotavirus relacionada con el aumento en las MOI, encontrando un promedio de acumulación de antígenos rotavirales del 25% en la MOI 2, con un máximo de 82% y un mínimo de 1%. La positividad de antígenos virales en las células PMBC fue considerablemente menor al de los linfoblastos, hallando un promedio de positividad del 3% en la MOI 2, con un máximo de 12% y un mínimo de 0% (**Fig. 11A**). Al analizar la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los ensayos de la *Fig. 11A*, se muestra un incremento en la señal de fluorescencia para los linfoblastos LLA-B inoculados con rotavirus de acuerdo con la MOI utilizada, obteniendo su máximo valor en la MOI de 2. Este incremento no se observó en las células PBMCs control (**Fig. 11B**). Llama la atención en estos dos análisis que en los resultados de los linfoblastos infectados se denota una distribución en 3 grupos característicos, teniendo un grupo aparentemente resistente a la infección, un grupo medianamente susceptible y un grupo altamente susceptible.

Para evaluar los efectos que presenta la inoculación con el rotavirus Wt1-5 adaptado la permeabilidad de la membrana celular de los Linfoblastos LLA-B (n=34) y de las PBMCs (n=34), estas células fueron inoculadas o no con rotavirus (MOI 1 y 2) y cultivados sin FBS. Se determinó la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión con el Azul de Tripán a las 24 h.p.i. Los resultados mostraron un incremento en la permeabilidad celular en los linfoblastos infectados, con un promedio poblacional de viabilidad del 84% en la MOI 1 (máxima del 96% y mínima del 38%) y con un promedio del 75% en la MOI 2 (máxima del 92% y mínima del 18%). Estas diferencias son estadísticamente significativas al compararlas con los grupos de células PBMCs control, quienes mantuvieron una viabilidad promedio del 90%. La viabilidad celular en los linfoblastos y las PBMCs para los grupos de células no infectadas o células inoculadas con rotavirus UV inactivado (MOI 2) se mantuvo en un promedio del 92% (**Fig. 11C**). Los resultados representan la desviación estándar (SD) de dos experimentos independientes realizados por duplicado. El análisis de los resultados sugiere que los linfoblastos LLA-B son susceptibles a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado de forma dependiente de la MOI empleada y que su replicación genera efectos citotóxicos en estas células, mientras que las PBMCs no son igualmente susceptibles, sugiriendo una selectividad del efecto oncolítico.

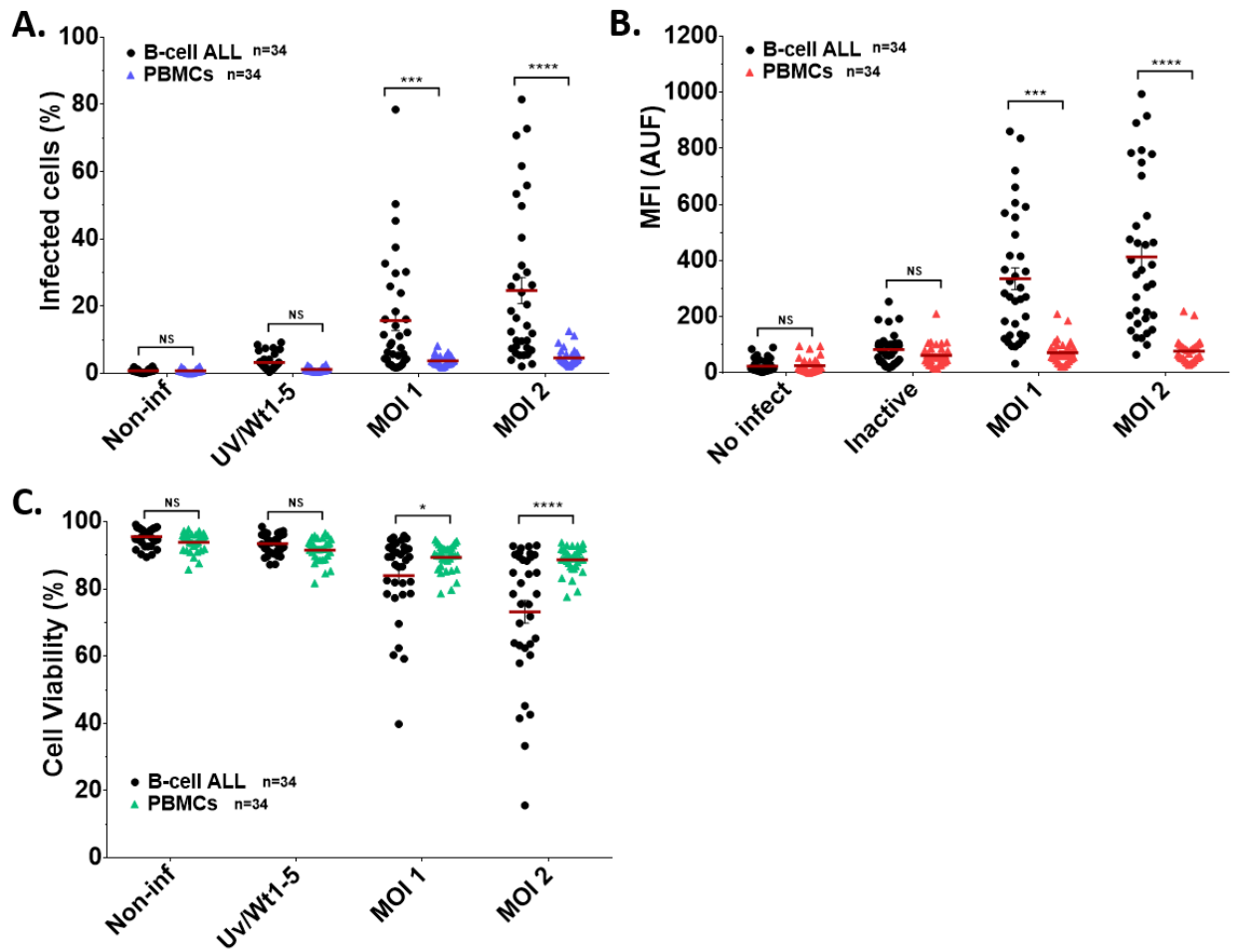


Figura 12. Análisis de infectividad del rotavirus Wt1-5 adaptado en linfoblastos LLA-B obtenidos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico confirmado de LLA-B que no han iniciado tratamiento y en PBMCs obtenidas del grupo control sano.

Los Linfoblastos LLA-B y las PBMCs recuperadas y purificadas de muestras de sangre periférica se procesaron inmediatamente, siendo inoculadas o no con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI 1 y 2) previamente activado con tripsina. Como control se empleó rotavirus previamente inactivado con luz UV (UV/Wt1-5) (MOI 2), luego de 24 h.p.i. las células fueron fijadas con PFD (paraformaldehído) y permeabilizadas. La **Fig. 11A** corresponde al análisis por citometría de flujo para la evaluación de la expresión de antígenos estructurales de rotavirus. En la **Fig. 11B** se representa la intensidad media de fluorescencia (MFI) para antígenos rotavirales para el mismo ensayo de la **Fig. 11A**. Se usaron anticuerpos de control de isotipo como control para ajustar los cuadrantes. La **Fig. 11C** corresponde al análisis del porcentaje de viabilidad de linfoblastos LLA-B y las PBMCs, determinada con la prueba de exclusión de Azul de Tripán. Los valores de todos los ensayos representados corresponden a la mediana de dos experimentos independientes por muestra obtenida de cada paciente. El número de muestras analizadas en los ensayos con linfoblastos fue $n=34$ y en las PBMCs fue $n=34$. Las muestras fueron recolectadas asincrónicamente.

4.12 Análisis de la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, β 3 y PDI en la membrana citoplasmática de los linfoblastos LLA-B y de las PBMCs

Se examinó el perfil de expresión de las proteínas celulares HSPs (90, 70, 60 y 40), Hsc70, PDI e integrina β 3 en los linfoblastos LLA-B (n=34) y en las PBMCs (n=34) no infectados mediante ensayos de citometría de flujo usando anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. Al analizar el porcentaje poblacional de expresión en los linfoblastos se encontró que todas las proteínas probadas mostraron niveles detectables, excepto para Hsp60 y Hsp40 siendo mayores para los linfoblastos LLA-B. Los porcentajes de expresión promedio en los linfoblastos se distribuyeron de la siguiente manera: Hsp70 (25%), Hsp90 (21%), PDI (18%), Hsc70 (10%), integrina β 3 (3%), Hsp60 (1%) y Hsp40 (0,5%), mientras que en las PBMCs se reportó lo siguiente: Hsp70 (17%), Hsp90 (8%), PDI (3%), Hsc70 (4%), integrina β 3 (4%), Hsp60 (0%) y Hsp40 (0%) (**Fig. 12A**). Al determinar los valores de MFI para la expresión de proteínas en los linfoblastos se encontró que el valor promedio más alto se observó para la proteína Hsp90 (550 AUF), seguido de las proteínas Hsp70 (490 AUF) y Hsc70 (320 AUF), PDI (110 AUF), mientras que los valores más bajos se observaron para las proteínas Hsp60, Hsp40 e integrina β 3. Con relación a los resultados encontrados en las PBMCs los valores de MFI fueron estadísticamente inferiores para todas las proteínas examinadas, con valores de MFI por debajo de 100 (AUF) (**Fig. 12B**). Sin embargo es notorio que en estos dos análisis, los resultados de los linfoblastos LLA-B muestran una distribución en 3 grupos característicos, teniendo un grupo con una alta expresión, un grupo con una media expresión y un grupo con una baja expresión. Mientras que en la población de células PBMCs la distribución es más homogénea.

Con el propósito de establecer una expresión simultánea de las proteínas de interés en cada una de las muestras se realizó un perfil comparativo de la expresión porcentual para esta, mediante un análisis 3D scatter Plot representados en los ejes XYZ entre las proteínas de la membrana citoplasmática Hsp90 (eje X), Hsp70 (eje Y), Hsp60, Hsp40, Hsc70, β 3 y PDI (todas eje Z) de los linfoblastos LLA-B (**Fig. 12C**) y de células PBMCs no infectadas (**Fig. 12D**). Para los linfoblastos se encontró una asociación en la expresión porcentual poblacional para las proteínas Hsp90, Hsp70 y β 3 (n=8), Hsp90, Hsp70 y Hsc70 (n=5) y para Hsp90, Hsp70 y PDI (n= 4), mientras que los linfoblastos que presentan baja expresión de Hsp90, Hsp70 igualmente presentan una baja expresión de Hsp60 y Hsp40

(**Fig. 12 C**). Este mismo análisis aplicado a las células PBMCs reportó una uniformidad hacia la baja expresión de todas las proteínas (**Fig. 12 D**).

Para establecer la participación de las proteínas analizadas en la infección por el rotavirus Wt1-5 en los linfoblastos LLA-B, las células fueron pre tratadas antes de la inoculación del rotavirus Wt1-5 (MOI 2) con anticuerpos policlonales dirigidos contra las HSPs (90, 70, 60 y 40), Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$. Luego de 24 h.p.i. las células fueron analizadas para antígenos estructurales (VP) de rotavirus mediante citometría de flujo. Los resultados indicaron que la incubación anticuerpos dirigidos contra las proteínas de interés de forma individual logran reducir el porcentaje de células positivas para VP. De forma similar a lo sucedido en la línea celular Reh (**Fig. 6C**), esta disminución ocurre en diferentes proporciones para cada anticuerpo y se relaciona con su concentración, siendo más evidente cuando los anticuerpos son adicionados a 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$. El mayor efecto sobre la disminución de la infección fue causado con el uso de anticuerpos dirigidos contra las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI y $\beta 3$, mostrando una reducción del 80%, 78%, 71%, 70% y 70% respectivamente. (Las células infectadas se usaron para normalizar el 100% de la infección). Mientras que el uso de anticuerpos dirigidos contra las proteínas Hsp60 o Hsp40 no logran disminuir el porcentaje de células positivas para proteínas virales estructurales. La mezcla de anticuerpos a una concentración de 0,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ cada uno, fue el tratamiento que redujo en una mayor proporción la infección pero no produjo efectos inhibidores aditivos sobre la acumulación de VP (20% de infección) (**Fig. 12E**). También se analizó la acumulación de proteínas estructurales de rotavirus también se estimaron en términos de unidades arbitrarias de MFI en los linfoblastos pre tratados con anticuerpos contra las proteínas de superficie. Esta estimación mostró una disminución de la MFI para antígenos VP de forma significativa con el pretratamiento con anticuerpos dirigidos contra las proteínas Hsp90, Hsc70, Hsp70 o la combinación de todos los anticuerpos (**Fig. 12F**). En conjunto estos resultados permiten sugerir que las proteínas celulares HSp90, Hsp70, Hsc70, $\beta 3$ y PDI están involucradas en la entrada de virus, sin excluir otros efectos intracelulares inducidos por anticuerpos que podrían contribuir con la disminución de éxito de la replicación viral.

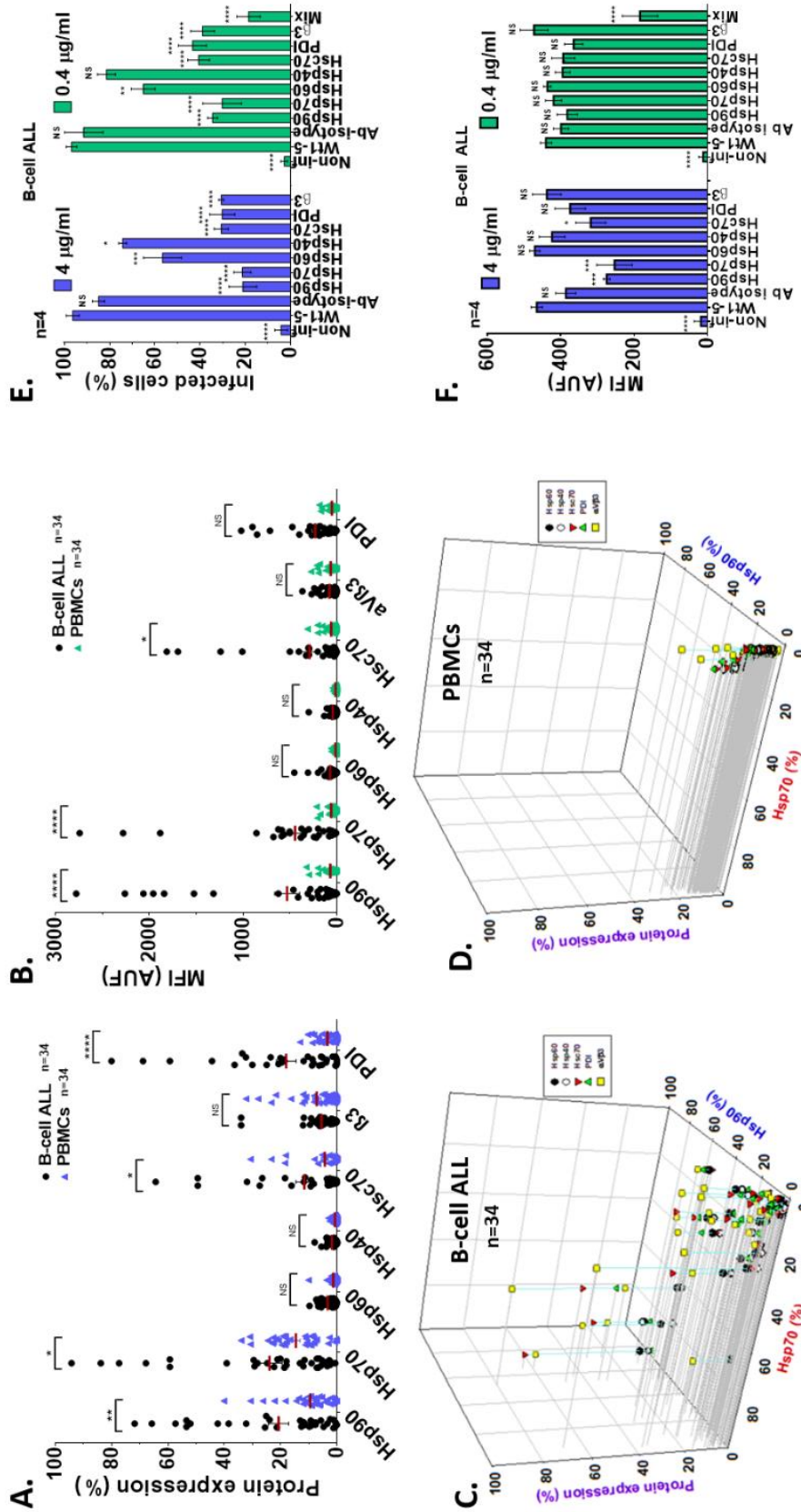


Figura 13. Análisis de la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, β 3 y PDI en la membrana citoplasmática de las PBMCs del grupo control sano y Ptes LLA-B que no han iniciado tratamiento.

Se analizó la expresión de las proteínas en la membrana citoplasmática de las PBMCs y de los linfoblastos LLA-B mediante citometría de flujo. El número de muestras analizadas en los ensayos de expresión de las proteínas en los linfoblastos fue n= 34 y en las PBMCs fue n=34. La **Fig. 12A** muestra los porcentajes de expresión para cada una de las proteínas analizadas del grupo control PBMCs y para las muestras LLA-B. La **Fig. 12B** representa la intensidad media de fluorescencia (IMF) para cada una de las proteínas de las PBMCs control y para las muestras LLA-B. Se usaron anticuerpos de control de isotipo como control para ajustar los cuadrantes. Estos resultados son representativos de dos diferentes ensayos. En la **Fig. 12C** se plasma el análisis 3D scatter Plot comparativo del porcentaje de expresión entre las proteínas de la membrana citoplasmática Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp30 y PDI de los linfoblastos LLA-B y en la **Fig. 12D** se representan los resultados para las PBMCs del grupo control. Los datos son representados en los ejes XYZ en un espacio 3D. El análisis de los datos se realizó con el software SigmaPlot 10.0 de 32-bit. En las **Fig. 12E** y **Fig. 12F** se analiza la importancia de las proteínas de la membrana citoplasmática Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, β 3 y PDI de los linfoblastos LLA-B, para desarrollar este análisis los linfoblastos LLA-B fueron incubados con concentraciones de 4 μ g/ml y 0.4 μ g/ml de anticuerpos policlonales dirigidos contra las proteínas Hsp90, 70, 60, 40, Hsc70, PDI y β 3 durante 1 hora, luego se realizaron lavados y se inocularon con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI de 2) previamente activado con tripsina. Se colectaron muestras a las 24 h.p.i siendo fijadas con PFA (paraformaldehído) y permeabilizadas. La **Fig. 12E** representa el % de infección y la **Fig. 12F** muestra la intensidad media de fluorescencia promedio. Se evaluó la presencia de antígenos rotavirales estructurales mediante citometría de flujo. Se usaron anticuerpos de control de isotipo para ajustar los cuadrantes. El número de muestras analizadas en los ensayos de bloqueo con anticuerpos en los linfoblastos fue n= 4 y en las PBMCs fue n=4.

4.13 Correlación entre expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, β 3 y PDI con los % de infección y muerte celular de los linfoblastos LLA-B y las PBMCs.

Para establecer una potencial asociación entre la expresión de antígenos virales, la disminución de la viabilidad y la expresión de las proteínas celulares HSPs (90, 70, 60 y 40), Hsc70, PDI e integrina β 3 en los linfoblastos LLA-B (n=34) y en las PBMCs (n=34) infectadas o no con el rotavirus Wt1-5 adaptado (MOI 2) luego de 24 h.p.i., se realizó un análisis 3D scatter Plot, donde el eje X representa la muerte celular analizada mediante la prueba de exclusión con Azul de Tripán, la expresión de las proteínas en la membrana citoplasmática se representa en el eje Y, y la expresión de antígenos estructurales (VP) de rotavirus para en el eje Z. El número de muestras analizadas fue n= 34. La (**Fig. 13A**) muestra el análisis 3D scatter Plot comparativo para las células no infectadas y la (**Fig. 13B**) muestra el análisis de células inoculadas con el rotavirus inactivados, encontrando en ambos ensayos un porcentaje poblacional de muerte promedio del 20%, con una expresión mayor del 50% para las proteínas Hsp70, Hsp90, Hsc70 y PDI en 6 muestras. La (**Fig. 13C**) indica los resultados para los linfoblastos inoculados con una MOI de 1 y la (**Fig. 13D**) muestra los resultados de células infectadas con una MOI de 2. Como tendencia general para la MOI de 1 y 2 se encontró que los linfoblastos LLA-B que presentaban mayores porcentajes de expresión de VP virales, simultáneamente presentaron una mayor expresión de proteínas Hsp90, Hsp70 e intermedias de Hsc70, β 3, PDI y bajas para Hsp60 y Hsp40, y al mismo tiempo presentaron porcentajes de mortalidad entre el 40-80% en la MOI 2 para 8 muestras. Estas diferencias son significativas en comparación con los grupos control de células no infectadas o células inoculadas con virus UV inactivado (**Fig. 13D**). Estos hallazgos se corroboraron mediante el análisis del coeficiente de correlación (regresión lineal) entre el % de infección y el porcentaje de mortalidad luego de 24 h.p.i. en linfoblastos LLA-B infectados o no con rotavirus Wt1-5 (**Fig. 13E - H**). La (**Fig. 13E**) muestra los resultados para los linfoblastos no infectados. La (**Fig. 13F**) muestra los resultados para linfoblastos LLA-B inoculados con el rotavirus adaptado UV inactivado. La (**Fig. 13G**) muestra linfoblastos LLA-B inoculados con el rotavirus adaptado a una MOI de 1 y la (**Fig. 13H**) para la MOI de 2. El cálculo de la regresión lineal para predecir el porcentaje de muerte celular asociada al porcentaje de infección encontró un valor $p < 0.0001$ y un r^2 de 0.794 para la MOI 2, un valor $p < 0.0001$ y un r^2 de 0.422 para la MOI 1, un valor $p < 0.0004$ y un r^2 de 0.418 para las células inoculadas con rotavirus UV inactivado

a MOI 2 y un valor $p < 0.0003$ y un r^2 de 0.127 para las los linfoblastos no infectados, sugiriendo que la muerte celular es debida a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado.

El análisis de correlación 3D scatter Plot en las PBMCs (**Fig. 14A-D**) que asocia la expresión de antígenos virales, la disminución de la viabilidad y la expresión de las proteínas celulares, encontró que en este grupo celular los porcentajes de expresión de VP virales son considerablemente menores a los hallados en los linfoblastos LLA-B, y así mismo presentaron una menor expresión de proteínas HSPs (90, 70, 60 y 40), Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$, sumados a bajos porcentajes de mortalidad con menos del 20% en la MOI 2 (**Fig. 13D**). Estas diferencias son equiparables a las obtenidas en el control de células PBMCs no infectadas o células inoculadas con virus UV inactivado y significativamente distintos a los encontrados en los linfoblastos (**Fig. 14A-C**).

El análisis de regresión lineal de las PBMCs (**Fig. 14E-H**) muestra los resultados del cálculo regresión lineal para predecir el porcentaje de muerte celular asociada al porcentaje de infección en las células PBMCs inoculadas o no con el rotavirus adaptado a las 24 h.p.i. En el grupo de células PBMCs infectadas se encontró un valor $p < 0.0001$ y un r^2 de 0.741 para la MOI 2 (**Fig. 14H**), un valor $p < 0.0001$ y un r^2 de 0.512 para la MOI 1 (**Fig. 14G**), un valor $p < 0.0002$ y un r^2 de 0.415 para las células inoculadas con rotavirus UV inactivado a MOI 2 (**Fig. 14F**), y un valor $p < 0.0001$ y un r^2 de 0.503 para las los linfoblastos no infectados (**Fig. 14E**). Sugiriendo que las PBMCs son resistentes a la infección y muerte celular asociadas a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado.

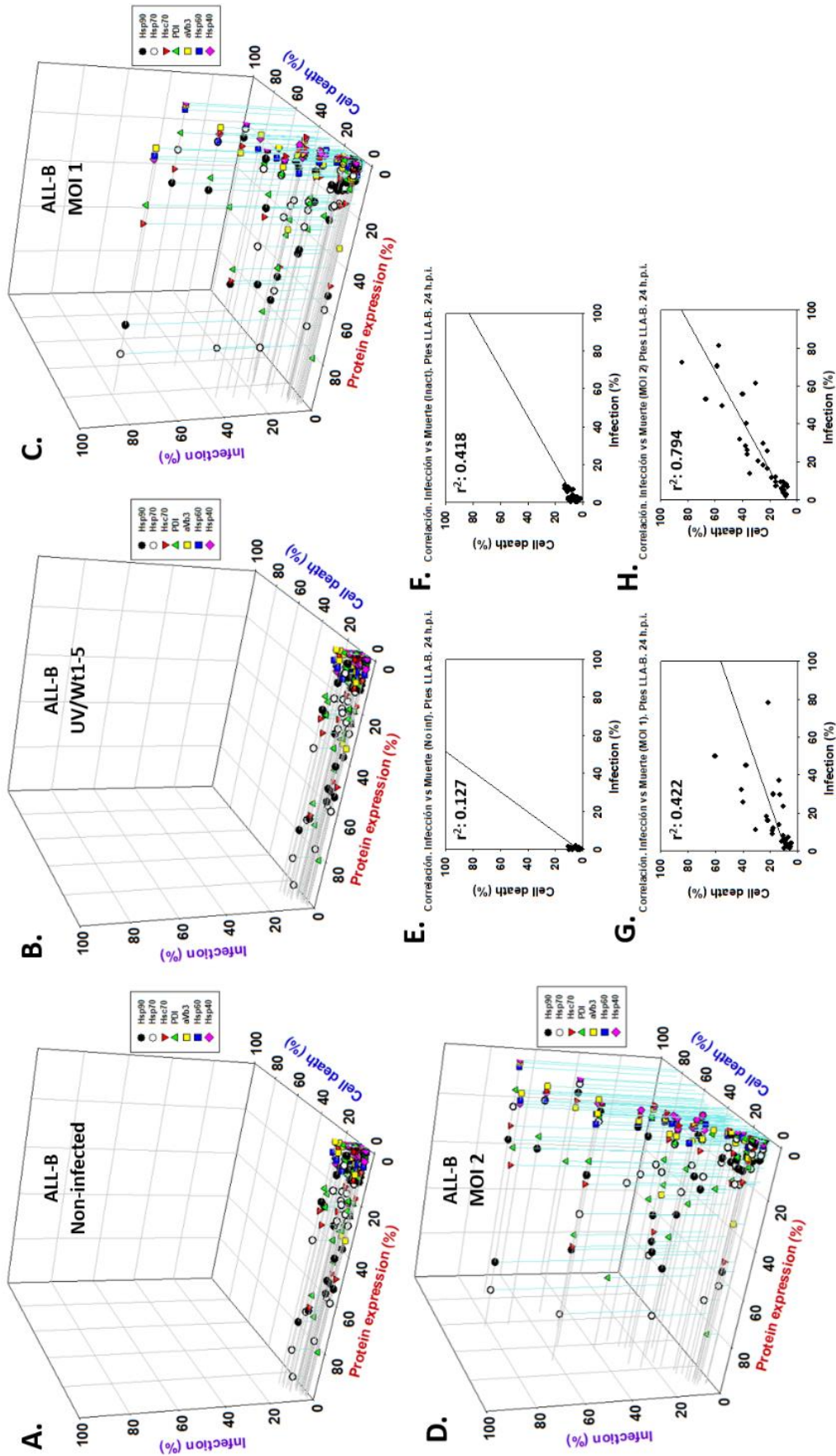


Figura 14. Análisis de correlación múltiple entre la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, $\alpha\gamma 83$ y PDI con los % de infección y muerte celular los linfoblastos LLA-B.

Se analizó la expresión de las proteínas en la membrana citoplasmática de los linfoblastos LLA-B mediante citometría de flujo (eje Y), se emplearon anticuerpos policlonales contra antígenos estructurales de rotavirus para determinar el % de infección (eje Z) y la muerte celular se analizó mediante la exclusión con Azul de Tripán (eje X) luego de 24 h.p.i. La **Fig. 13A** muestra el análisis 3D scatter Plot comparativo para las células no infectadas. La **Fig. 13B** muestra el análisis de células inoculadas con el rotavirus inactivado. La **Fig. 13C** indica los resultados para los linfoblastos inoculados con una MOI de 1 y la **Fig. 13D** muestra los resultados de células infectadas con una MOI de 2. Los datos son representados en los ejes XYZ en un espacio 3D. El análisis de los datos se realizó con el software Sigma Plot 10.0 de 32-bit. Las **Fig. 13E - H** representan el análisis del coeficiente de correlación (regresión lineal) entre el % de infección y el porcentaje de mortalidad luego de 24 h.p.i., en linfoblastos LLA-B no infectados (**Fig. 13E**), linfoblastos LLA-B inoculados con el rotavirus adaptado previamente inactivado (**Fig. 13F**), linfoblastos LLA-B inoculados a una MOI de 1 (**Fig. 13G**) y una MOI de 2 (**Fig. 13H**), los valores para r^2 son indicados en cada figura. El número de muestras analizadas fue $n = 34$.

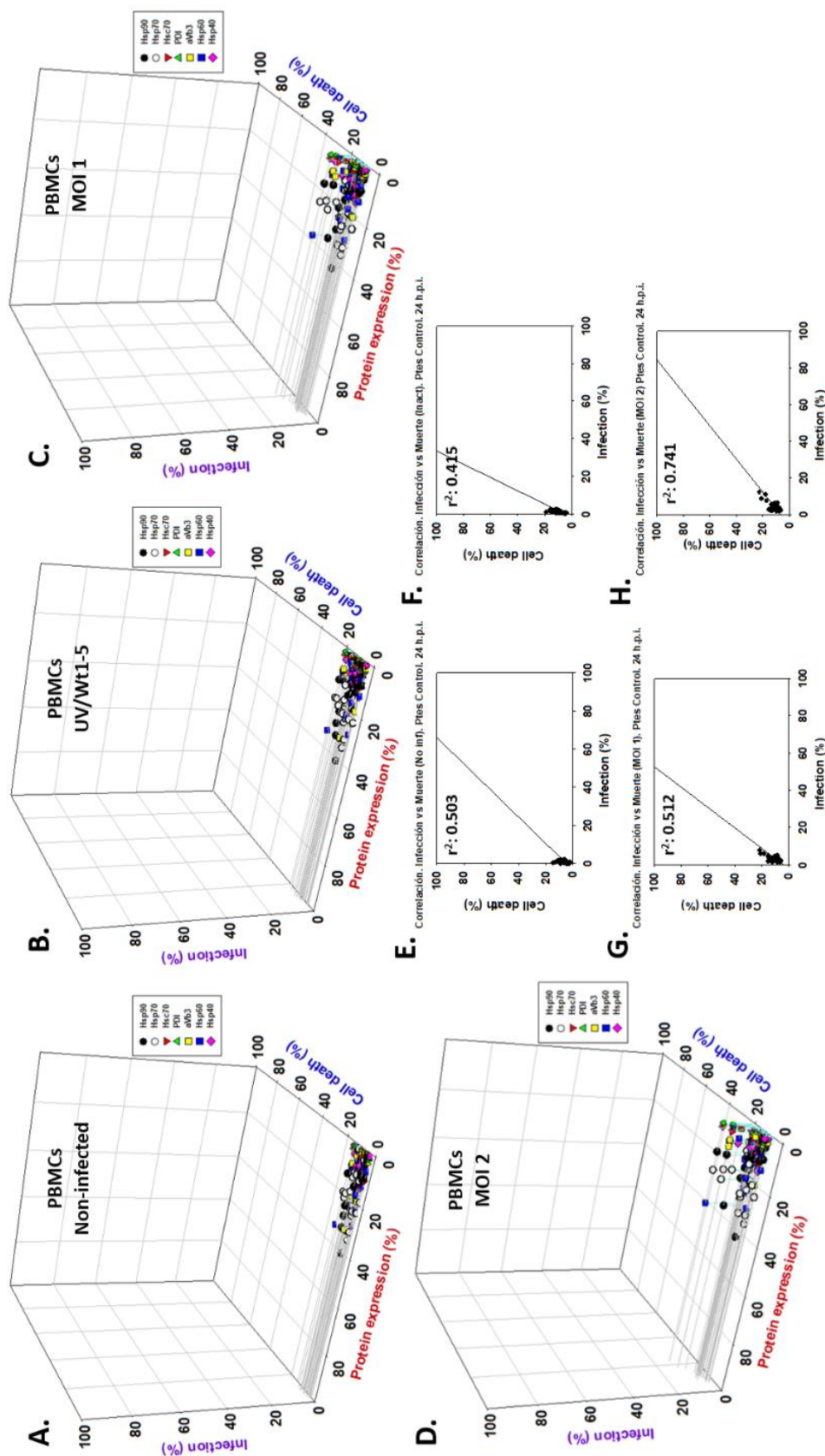


Figura 15. Análisis de correlación múltiple entre la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, avβ3 y PDI con los % de infección y muerte celular de las PBMCs del grupo control sano.

Se analizó la expresión de las proteínas en la membrana citoplasmática de las PBMCs mediante citometría de flujo (eje Y), se emplearon anticuerpos policlonales contra antígenos estructurales de rotavirus para determinar el % de infección (eje Z) y la muerte celular se analizó mediante la exclusión de células no infectadas. La **Fig. 14B** muestra el análisis 3D scatter Plot comparativo para las células no infectadas. La **Fig. 14C** muestra el análisis de células inoculadas con el rotavirus inactivado. La **Fig. 14D** muestra los resultados de células infectadas con una MOI de 1 y la **Fig. 14E** muestra los resultados de células infectadas con una MOI de 2. Los datos son representados en los ejes XYZ en un espacio 3D. El análisis de los datos se realizó con el software Sigma Plot 10.0 de 32-bit. Las **Fig. 14E-H** representan el análisis de correlación (regresión lineal) entre el % de infección y el porcentaje de mortalidad luego de 24 h.p.i., en PBMCs no infectadas (**Fig. 14E**), PBMCs inoculadas con el rotavirus adaptado previamente inactivado (**Fig. 14F**), PBMCs inoculadas con el rotavirus adaptado a una MOI de 1 (**Fig. 14G**), y una MOI de 2 (**Fig. 14H**), los valores para r^2 son indicados en cada figura. n = 34 pacientes. El número de muestras analizadas fue n= 34.

4.14 Análisis multivariado de las muestras de linfoblastos LLA-B y PBMCs.

Se realizó un análisis de componentes principales (en español ACP, en inglés Principal component analysis, PCA) para las variables infección (en % y MFI), muerte celular (en %), y expresión de proteínas celulares (en % y MFI) en los grupos de células no infectadas, células inoculadas con virus UV inactivado, células inoculadas a una MOI 1 y MOI 2 luego de 24 h.p.i., tanto en los linfoblastos LLA-B (**Fig. 15A**) como en las células PBMCs (**Fig. 15B**). La gráfica del análisis de los linfoblastos LLA-B mostró claramente dos diferentes grupos en las composiciones vectoriales. En el grupo correspondiente al primer componente se encontraron agrupadas las variables de expresión de proteínas (% y MFI) para las proteínas Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, PDI y β 3, así como la MFI para células no infectadas o células inoculadas con rotavirus UV inactivado. En el grupo perteneciente al segundo componente se hallaron agrupadas las variables de infección y muerte celular (% y MFI) así como la MFI de la Hsp90. En general la diferencia en las desviaciones estándar (SD) se encontraba entre 0.1 - 0.25. Estos resultados sugieren que la susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado y la muerte celular asociada a la infección se relacionan principalmente con la intensidad en la expresión de la proteína Hsp90 de la superficie celular, sin que mediante este análisis podamos descartar la asociación funcional biológica con las demás proteínas debido a la orientación vectorial cercana hacia el primer componente (**Fig. 15A**).

La gráfica del análisis de componentes principales de las PBMCs mostró un grupo principal y varios grupos divergentes. El grupo correspondiente al grupo principal se relaciona con ambos componentes y en este se encontraron agrupadas las variables de infección y muerte celular (% y MFI) y Hsp90 (%), conexas con una orientación vectorial opuesta para la expresión de las proteínas Hsp70 y PDI (MFI) y Hsp60 (%). Dentro de los grupos divergentes se resaltan la agrupación hacia el primer componente de las variables no infección (%) y la expresión de la integrina β 3 (MFI), la expresión de la Hsc70 (%) con no infección (MFI) y una con una orientación vectorial opuesta para la expresión de la integrina β 3 (%). Estos resultados sugieren que la mayor expresión de la Hsp90 (%) puede relacionarse con cierto grado de susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 en las PBMCs y que aquellas células que se encuentran infectadas con rotavirus mueren.

También se puede sugerir que la expresión de la integrina $\beta 3$ (%) se relaciona de forma opuesta con la no infección.

En las (**Fig. 15C y 15D**) se muestran esquemáticamente mediante una matriz los resultados del análisis de correlación de Pearson para las variables analizadas en las *Fig. 15A* y *Fig. 15B* respectivamente. Los valores son representados mediante un mapa de calor en donde un valor de correlación de cero se indica en color crema claro, un valor de correlación de 1 se indica en color rojo y un valor de correlación de -1 se representa en color verde. Para los linfoblastos LLA-B los resultados de correlación mostraron una correlación positiva entre susceptibilidad a la infección (MOI 1 y 2) y la expresión de las proteínas Hsp90, Hsp70 tanto en % como en MFI y con las proteínas Hsc70 y PDI en MFI (índice de Pearson entre 0.5-0.9). También se encontró una correlación positiva para la expresión simultánea de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70 y PDI en % y MFI (índice de Pearson entre 0.6-0.95) (**Fig. 15C**). Al aplicar este análisis a las PBMCs se encontró una correlación positiva significativa entre la susceptibilidad a la infección (%) y los porcentajes de muerte celular (%) (Índice de Pearson entre 0.45-0.75), y una correlación negativa entre la expresión de las proteínas (baja) y la susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 (índice de Pearson entre -0.45 y - 0.95). Confirmando la asociación biológica entre la presencia de estas proteínas en la membrana citoplasmática y la susceptibilidad a la infección.

Con el propósito de establecer una relación entre algunas de las variables recolectadas de la historia clínica con los resultados del laboratorio, se desarrolló un análisis de correspondencias múltiples para las variables que se mencionan a continuación: % de blastos en sangre periférica, presencia de anomalías citogenéticas, recaída, muerte del paciente, compromiso del SNC, Riesgo al momento del diagnóstico (riesgo estándar, intermedio o alto), fenotipo de la leucemia (B-Común, Pro-B, Pre-B o Mixta B/mieloide), % de expresión en % de las proteínas HSP (90, 60, 70, 60, 40), Hsc70, PDI y $\beta 3$, Infección y muerte en la MOI 2 luego de 24 h.p.i. Los datos fueron agrupados en rangos (0.0%-33.3%, 33.4%-66.6% y 66.7%-100%) para cada una de las variables. En este análisis llama la atención la asociación entre la expresión de las proteínas Hsp70 (66-100%) y la Hsc70 (0-32%) con el alto riesgo al momento del diagnóstico, el compromiso del SNC y la muerte de los pacientes, así como la relación entre la expresión de la proteína PDI (33-45%) con la susceptibilidad a la infección (33-65%) y la muerte celular (33-100%). También se

reportó la asociación entre la expresión de las proteínas Hsc70 (33-65%), la Hsp70 (33-65%) y la integrina $\beta 3$ (33-65%). Por otro lado también se denota la relación entre el riesgo de recaída de los pacientes con leucemia LLA-Pro B, como también la correspondencia en la expresión de la Hsp90 (33-66%) con el porcentaje de blastos en sangre periférica (66-100%) (**Fig. 15C**). Estos resultados dan paso a sugerir un uso potencial de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsc70, $\beta 3$ y PDI como marcadores de riesgo clínico y de susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado en pacientes con leucemia aguda de precursores B. Los resultados de laboratorio individualmente obtenidos para los linfoblastos LLA-B y las PBMCs pueden ser consultados en las Tablas 12 y 13.

4.15 Caracterización electroferotípica y genotípica del rotavirus Wt1-5 adaptado.

Para caracterizar el patrón de corrido electroforético del dsRNA del rotavirus Wt1-5 adaptado se extrajo el dsRNA viral con la técnica estándar de fenol-cloroformo a partir de viriones de rotavirus Wt1-5 purificados en un gradiente de densidad con cloruro de cesio. El dsRNA rotaviral fue analizado mediante electroforesis PAGE al 10% a 13 mA a temperatura ambiente (22 °C) durante 24 horas. Posteriormente el gel fue teñido con plata. En la (**Fig. 16A**) el primer carril corresponde al aislamiento Wt1-5, el carril número 2 corresponde al aislamiento Wt1-1 y el tercer carril al aislamiento Wt-2. En estos ensayos se encontró que los patrones de migración electroforética fueron esencialmente los mismos, mostrando 11 segmentos genómicos con un patrón de distribución estándar de rotavirus del grupo A de 4-3-2-2. En la (**Fig. 16B**) se muestra la distribución del tamaño del genoma del rotavirus Wt1-5 adaptado mediante una gráfica de densidad. Se muestran 3 picos principales que se corresponden al rango de tamaños de los segmentos rotavirales aproximadamente desde los 660 a 3,300 nucleótidos, cuyo tamaño genómico total es de alrededor de 18,500 pares de bases (pb).

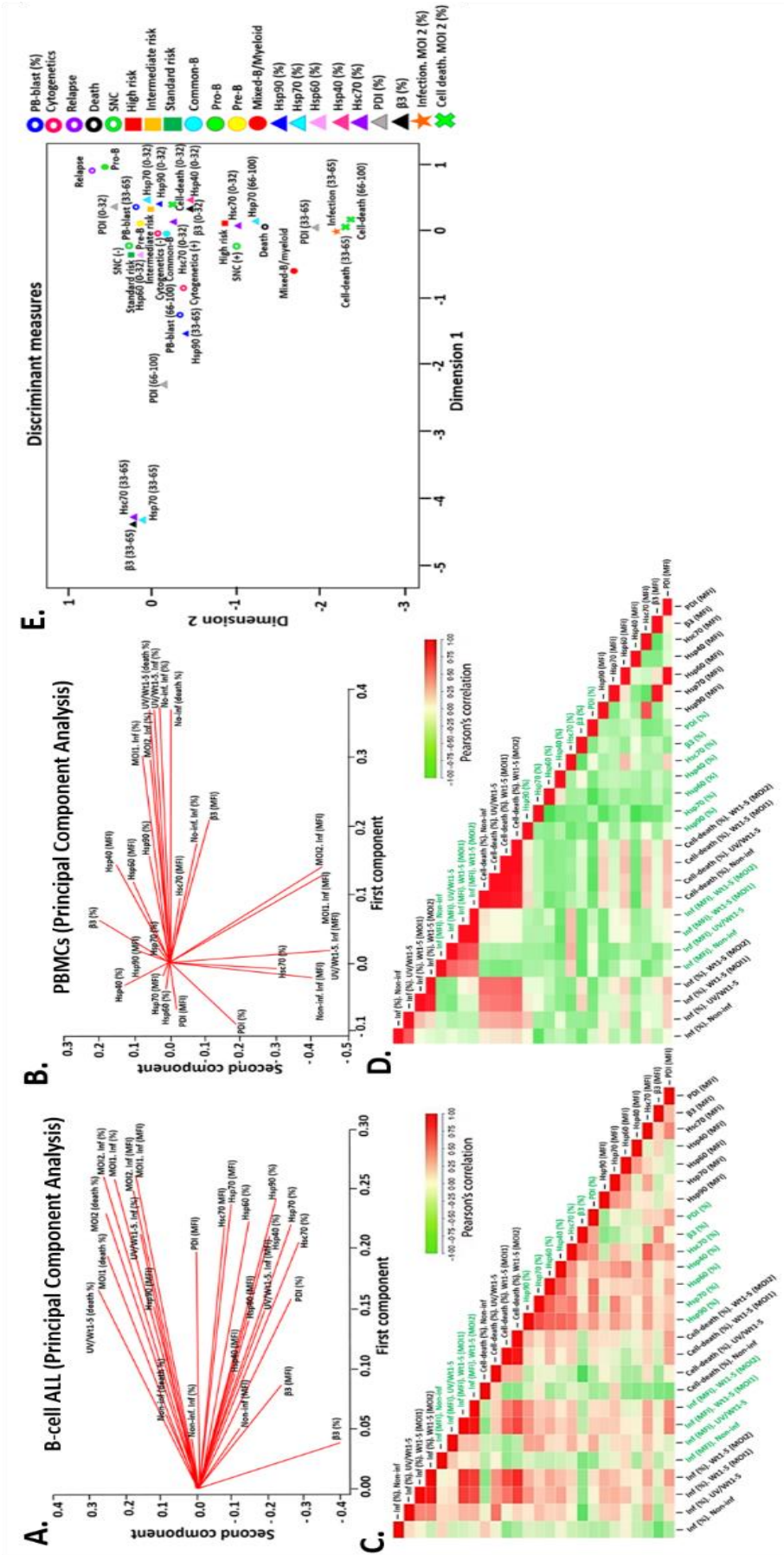


Figura 16. Análisis multivariado de las muestras de linfoblastos LLA-B y PBMCs.

Las Fig. 15A (LLA-B) y Fig. 15B (PBMCs) muestran el análisis de componentes principales para las variables de laboratorio, cada grupo con un $n = 34$. Se realizó un análisis de importancia variable de doble proyección. Con base en los coeficientes de regresión obtenidos de cada submodelo, se verificó la incertidumbre de cada variable y se realizó la proyección en un gráfico 2D. La Fig. 15C corresponde a una matriz de correlación de Pearson para las mismas variables de la Fig. 15A (LLA-B). Los colores rojo y verde indican una alta correlación positiva o negativa respectivamente entre las variables. La Fig. 15D representa un análisis similar al hecho en la Fig. 15C pero sobre el grupo control PBMCs de la Fig. 15B. La Fig. 15E muestra el análisis de correspondencias múltiples para los datos de los pacientes LLA-B agrupados en rangos (0.0%-33.3%, 33.4%-66.6% y 66.7%-100%) para cada una de las variables señaladas en las leyendas de la figura con un $n = 34$. Los análisis de componentes principales y de correspondencias múltiples se realizaron utilizando el entorno del Software SPSS versión 24.0.

Tabla 12. Resultados de laboratorio de las muestras de linfoblastos LLA-B inoculados con rotavirus Wt1-5 luego de 24 h.p.i.

Table with 33 columns and 34 rows. Columns include: N°, Non-inf, UV/Wt1-5, Wt1-5 (MOI 1), Wt1-5 (MOI 2), Infected cells (% (24 h.p.i.)), Infected cells (MFI) (24 h.p.i.), Cell death (% (24 h.p.i.)), Protein expression (%), and Protein expression (MFI). Rows 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 contain data with red and blue highlights.

La tabla de datos muestra los resultados de laboratorio para los linfoblastos LLA-B inoculados o no con rotavirus Wt1-5 luego de 24 h.p.i. Los datos mostrados son el porcentaje de infección, la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la infección, el porcentaje de muerte celular, el porcentaje de expresión y la MFI de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, β3 y PDI al momento de la recolección de las muestras previamente al desarrollo de los ensayos de infección. Los recuadros rojos muestran los porcentajes mayores al 50% y los recuadros azules muestran los porcentajes entre el 25.0%-49.9%.

Tabla 13. Resultados de laboratorio de las PBMCs del grupo control sano inoculadas con rotavirus Wt1-5 luego de 24 h.p.i.

Table with 33 columns and 34 rows. Columns include: N°, Non-inf, UV/Wt1-5, Wt1-5 (MOI 1), Wt1-5 (MOI 2), Infected cells (% (24 h.p.i.)), Infected cells (MFI) (24 h.p.i.), Cell death (% (24 h.p.i.)), Protein expression (%), and Protein expression (MFI). Rows 1 through 34 contain data with green highlights.

Tabla de datos que muestra los resultados de laboratorio para las PBMCs del grupo control sano inoculadas o no con rotavirus Wt1-5 luego de 24 h.p.i. Los datos mostrados son el porcentaje de infección, la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la infección, el porcentaje de muerte celular, el porcentaje de expresión y la MFI de las proteínas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, β3 y PDI al momento de la recolección de las muestras previamente al desarrollo de los ensayos de infección. Los recuadros azules muestran los porcentajes entre el 25.0%-49.9% y los recuadros verdes muestran los porcentajes entre 10.0%-24.9%.

Para realizar la identificación genotípica del rotavirus Wt1-5 adaptado se realizó RT-PCR y PCR semi-anidada para la amplificación de los fragmentos rotavirales VP7 y VP4 de acuerdo a las condiciones estandarizadas en el laboratorio. Los amplificadores se analizaron en gel de Agarosa al 2% a 100 mV por 1 hora a temperatura ambiente (22 °C) y fueron visualizados con SyBR® Safe DNA gel Stain. La (**Fig. 16C**) muestra los resultados para la genotipificación del genotipo G (VP7), encontrando una amplificación para el segmento VP7 (tamaño 896 pb) y para los genogrupos G3 (tamaño 464 pb) y G4 (tamaño 403 pb) señalados con flechas blancas. La (**Fig. 16D**) muestra los resultados para la genotipificación del genotipo P (VP4), encontrando una amplificación para el segmento VP4 (tamaño 876 pb) y para los genogrupos P4 (tamaño 483 pb) y P11 (tamaño 112 pb) señalados con flechas blancas. Las especificidades de los cebadores (Primer) para VP4 y VP7 se evaluaron comparándolos con secuencias de referencia de la base de datos de GenBank. Este análisis *in silico* confirmó las especificidades de todos los cebadores. Las secuencias de los cebadores empleados para la genotipificación pueden ser consultadas en el **Anexo 1**.

4.16 Análisis filogenético del rotavirus Wt1-5 adaptado

En la (**Fig. 17**) se muestra el análisis filogenético mediante la representación de filogramas que indican las relaciones genéticas de las secuencias parciales de nucleótidos de los genes VP1, VP2, VP3, VP4, NSP1 y NSP3 del rotavirus Wt1-5 adaptado obtenidas mediante secuenciamiento del dsRNA viral (para consultar las secuencias del rotavirus Wt1-5 adaptado ver **Anexo 2**), con las cepas de referencia de rotavirus Wa, Wi, 69M, RRV, UK, YM y OSU reportadas en las bases de datos de GenBank. Las relaciones evolutivas se dedujeron mediante la alineación de secuencias múltiples con la herramienta MUSCLE (MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation) y con el método de ensamblaje dirigido al genoma viral basado en fuentes de información VirusTAP (Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline). Se usó el modelo de distancia p para calcular las distancias evolutivas. Las longitudes de rama horizontales del filograma son proporcionales a la divergencia evolutiva y los números al lado de las notaciones del filograma señalan el distanciamiento evolutivo de las secuencias analizadas (0= cercanía, 1= distanciamiento).

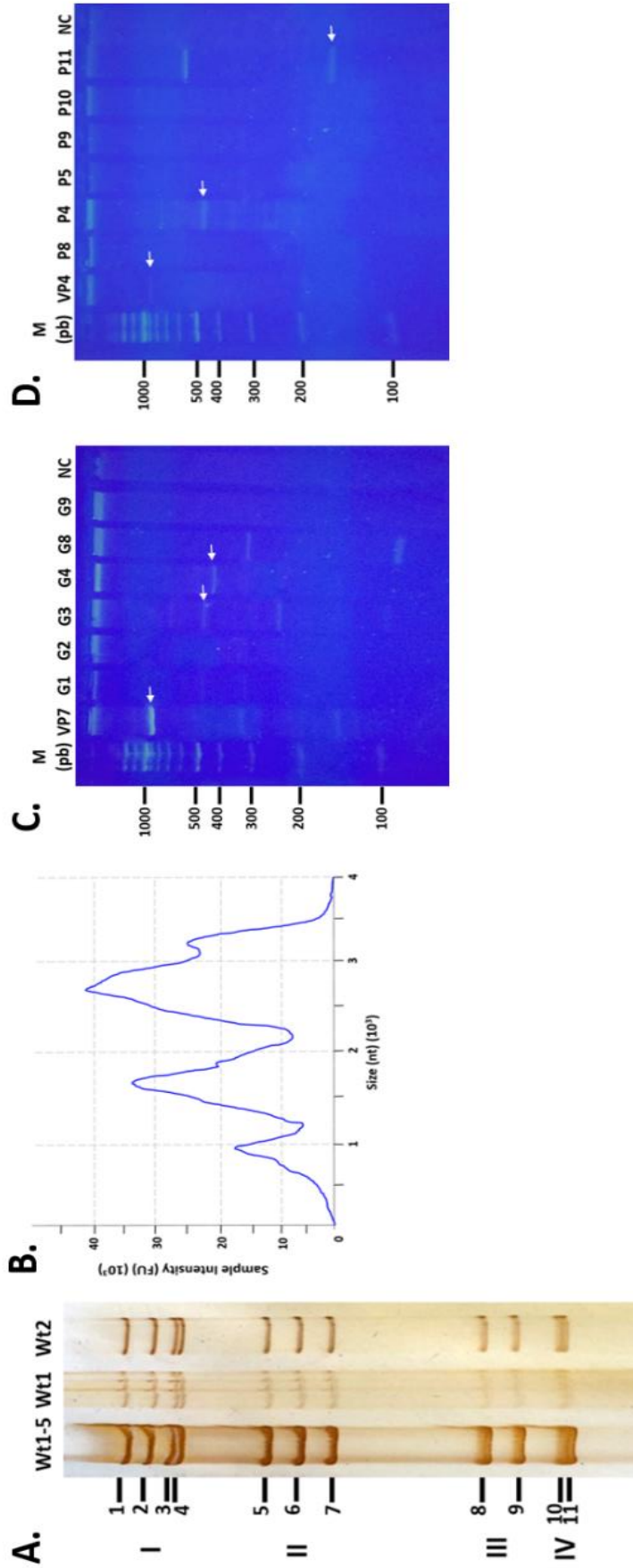


Figura 17. Caracterización electroferotípica y genotípica del rotavirus Wt1-5 adaptado.

Se extrajo el dsRNA viral con fenol-cloroformo a partir de viriones de rotavirus Wt1-5 purificados en un gradiente de densidad con cloruro de cesio de un cultivo viral en células Reh (MOI de 2) luego de 24 h. p.i. La **Fig. 16A** muestra los patrones de migración electroforética del dsRNA genómico del rotavirus Wt1-5 adaptado analizados por PAGE al 10% a 13 mA por 24 horas a temperatura ambiente (22 °C). El gel fue teñido con plata. El primer carril corresponde al aislamiento Wt1-5, el carril número 2 corresponde al aislamiento Wt1-1 y el tercer carril al aislamiento Wt-2. En la **Fig. 16B** se muestra la distribución del tamaño del genoma del rotavirus Wt1-5 adaptado mediante una gráfica de densidad. La **Fig. 16C** y **D** muestran la detección y genotipificación por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) de los genes rotavirales VP4 (Genotipo P) **Fig. 16C** y VP7 (Genotipo G) **Fig. 16D**. Los amplificadores se analizaron en gel de Agarosa al 2% a 100 mV por 1 hora a temperatura ambiente (22 °C). Se visualizó el cDNA con SyBR® Safe DNA gel Stain. Se usó un marcador de 100 pb. Control negativo (NC).

El grupo de contig del rotavirus Wt1-5 adaptado se muestra en color azul, mientras que en color rojo oscuro se representa la secuencia de referencia GenBank que mostró una mayor homología. El análisis de los contig muestra los siguientes resultados: Para el contig >Wt1-5contig _3 la longitud reportada fue de 1881 nt y presentó una homología del 99.95% con el segmento 1 del dsRNA (longitud de 3269 nt) de un rotavirus del grupo A (Wa, G1; P8) que codifica para la proteína VP1 (GenBank Ref: KJ659453.1) con un score de distanciamiento evolutivo de 0. Para el contig >Wt1-5contig _1 la longitud reportada fue de 2646 nt y presentó una homología del 99.96% con el segmento 2 del dsRNA (longitud de 2717 nt) de un rotavirus del grupo A (Wa, G1; P8) que codifica para la proteína VP2 (GenBank Ref: KT694940.1) con un score de distanciamiento evolutivo de 0.00019. Para el contig >Wt1-5contig _2 la longitud reportada fue de 2495 nt y presentó una homología del 99.96% con el segmento 3 del dsRNA (longitud de 2591 nt) de un rotavirus del grupo A (Wa variante Wag7) que codifica para la proteína VP3 (GenBank Ref: FJ423137.1) con un score de distanciamiento evolutivo de 0. Para el contig >Wt1-5contig _6 la longitud reportada fue de 1098 nt y presentó una homología del 99.91% con el segmento 4 del dsRNA (longitud de 2359 nt) de un rotavirus del grupo A (Wa, G1; P8) que codifica para la proteína VP4 (GenBank Ref: FJ423137.1) con un score de distanciamiento evolutivo de 0.00105. Para el contig >Wt1-5contig _4 la longitud reportada fue de 1449 nt y presentó una homología del 99.93% con el segmento 5 del dsRNA (longitud de 1566 nt) de un rotavirus del grupo A (Wa, G1; P8) que codifica para la proteína NSP1 (GenBank Ref: KT694945.1) con un score de distanciamiento evolutivo de 0. Finalmente para el contig >Wt1-5contig _7 la longitud reportada fue de 1024 nt y presentó una homología del 99.9% con el segmento 7 del dsRNA (longitud de 1074 nt) de un rotavirus del grupo A (Wa, G1; P8) que codifica para la proteína NSP3 (GenBank Ref: AF190170.1) con un score de distanciamiento evolutivo de 0. Los demás segmentos genómicos del rotavirus Wt1-5 no estuvieron representados en los contig reportados por el ensamblaje de la secuencia. Para consultar los resultados del alineamiento múltiple con las cepas de referencia Wa, Wi, 69M, RRV, UK, YM y OSU ver **Anexo 3**.



Figura 18. Análisis filogenético del rotavirus Wt1-5 adaptado.

Se muestran los filogramas que indican las relaciones genéticas de las secuencias parciales de nucleótidos de los genes VP1, VP2, VP3, VP4, NSP1 y NSP3 del rotavirus Wt1-5 adaptado, con las cepas de referencia de rotavirus Wa, Wt1, 69M, RRV, UK, YM y OSU reportadas en las bases de datos de GenBank. El modelo de distancia p se usó para calcular las distancias evolutivas. El grupo de contig del rotavirus Wt1-5 adaptado se muestra en color azul, mientras que en color rojo oscuro se representa la secuencia de referencia que mostró una mayor homología. Los datos acompañantes de la parte central muestran los porcentajes de identidad comparativa entre el rotavirus Wt1-5 (línea punteada de color rojo) y las cepas de referencia indicado el nombre para cada una de ellas. Las longitudes de rama horizontales del filograma son proporcionales a la divergencia evolutiva y los números al lado de las notaciones del filograma señalan el distanciamiento evolutivo de las secuencias analizadas (0= cercanía, 1= distanciamiento).

5. Capítulo 5. Discusión

El tratamiento del cáncer busca constantemente hallar nuevas y mejores metodologías terapéuticas y los investigadores interesados en este tema suman esfuerzos para encontrar modalidades de terapia basadas en el conocimiento de la biología molecular del cáncer. Dentro de estas nuevas terapias, los virus oncolíticos han tenido gran interés debido a su capacidad de replicarse preferentemente en células cancerosas mientras que respetan a sus contrapartes normales (39, 229, 230). Aunque los rotavirus muestran naturalmente una capacidad de infectar a los enterocitos maduros (87), trabajos previos del Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia han reportado que varios aislamientos de rotavirus pueden infectar diversas líneas celulares tumorales tales como células Sp/2 Ag-14 (Mieloma murino), U-937 (linfoma histiocito humano), PC-3 (Adenocarcinoma de próstata humano), KATO-3 (Adenocarcinoma gástrico humano), A549 (Carcinoma pulmonar humano) y MCF-7 (Adenocarcinoma de seno humano); encontrando que estos aislamientos rotavirales pueden tener propiedades oncolíticas, pero no tienen citotoxicidad en los fibroblastos primarios sanos o células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) (37).

En este trabajo, encontramos que la línea celular de leucemia linfocítica aguda Reh y los linfoblastos LLA-B son permisivas a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado aumentando constantemente con el tiempo y dependiendo de la MOI utilizada. Adicionalmente, al tomar diluciones de alícuotas del sobrenadante que fueron recolectados en diferentes momentos posteriores a la infección del cultivo, estos lisados pudieron infectar células no retadas previamente con rotavirus, lo que sugiere que se formaron viriones infecciosos maduros, los cuales completan su ciclo replicativo alrededor de las 8-12 h.p.i. Importantly, las células PBMCs fueron en general no permisivas a la infección por rotavirus Wt1-5. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Carreño J. y Eichwald C., quienes encontraron que la acumulación de antígenos virales comienza incluso tan tempranamente como 2 h.p.i. con un aumento tanto en el número como en el tamaño de los viroplasmos con el tiempo, y este incremento dependió de la MOI utilizada, sugiriendo que nuevos viroplasmos pequeños se generan constantemente durante el ciclo de replicación al depender de la MOI usada para alcanzar una

concentración crítica de las proteínas rotavirales NSP2 y NSP5 y señalan una duración promedio del ciclo viral entre 8 a 10 h.p.i. en células MA104 permisivas (231, 232). El hallazgo de la permisividad a la replicación del rotavirus en los linfoblastos y las células Reh, se suma a la ya reportada en células de epitelio renal de mono verde (MA104), células de adenocarcinoma de colon (Caco-2) y carcinoma hepático (HepG2), donde se ha demostrado que la permisividad es debida a la presencia de moléculas receptoras siendo determinantes principales del tropismo de los rotavirus (22, 26, 27).

Otro hallazgo relacionado con la infección del aislamiento Wt1-5 fue que la capacidad infecciosa del rotavirus se redujo parcialmente ante la presencia de FBS en el cultivo celular. Paul A. Offit y Sato K han establecido la presencia consistente de anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la cápside interna y las proteínas de la cápside externa del rotavirus en el FBS y en suero materno a diluciones de suero de 1: 50 y 1: 500 (233, 234), pero las inmunoglobulinas purificadas recuperadas del FBS por cromatografía de afinidad con proteína A no fueron responsables de la neutralización de la infección por rotavirus observada con la suplementación de FBS. Por otro lado Estes y colaboradores usando un ensayo de fijación del complemento, no pudieron detectar anticuerpos contra rotavirus en preparaciones comerciales de FBS. Sin embargo, encontraron que la inclusión de FBS en el medio de crecimiento viral disminuyó la infectividad de rotavirus de 5 a 15 veces (235). Concluyendo que la neutralización de la infección por rotavirus asociada con la suplementación de FBS puede ser el resultado de la actividad antiproteasa sérica o de las inmunoglobulinas bovinas que no se unen a la proteína A. Adicionalmente, estos autores postulan que debido a que no se conoce que los rotavirus causen infección *In útero*, la presencia de anticuerpos específicos contra rotavirus en el FBS sugiere estas inmunoglobulinas se transfieren pasivamente a través de la placenta bovina intacta. Sin embargo, con los ensayos desarrollados en el presente trabajo no se pueden establecer diferencias comparativas en la producción de nuevas partículas virales infecciosas con otras líneas celulares tales como MA104 o CaCo2 así como con otras cepas rotavirales de referencia, para así establecer la eficacia real del rotavirus Wt1-5.

El presente estudio evaluó algunas señales muerte celular asociadas con la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado en los linfoblastos LLA-B y la línea de leucemia linfoblástica humana Reh como un enfoque para comprender la muerte inducida por este potencial virus oncolítico. Encontramos que la inoculación con rotavirus Wt1-5 en los linfoblastos LLA-B y en células Reh, indujo cambios en la permeabilidad de la membrana citoplasmática y la

expresión de señales de muerte celular relacionadas con apoptosis, encontrando un incremento en el porcentaje de células positivas para DiOC6, 7-AAD, LDH y Caspasas 3 y 8 en células infectadas, además de la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA (TUNEL y PARP). En este estudio también se encontró que la infección por el rotavirus adaptado llevó a la disminución de la actividad oxidorreductiva mitocondrial. Todos los anteriores efectos fueron uniformes en la línea celular Reh, pero se han encontrado diferencias individuales en los blastos LLA-B de aislados de los pacientes. Las señales de muerte celular evaluadas indican un mecanismo de muerte apoptótica principalmente, aunque existe una población celular que muestra un perfil de muerte relacionado con necrosis. Estos modos de muerte celular muestran una dependencia de la multiplicidad de infección (MOI) empleada, mostrando un perfil apoptótico con MOI bajas y Necrosis a mayores dosis de inóculo viral. Sin embargo, las células Reh infectadas por rotavirus parecen experimentar lisis, en su mayoría de forma dependiente de la concentración del inóculo viral. Hemos reportado que incluso la inoculación con el rotavirus Wt1-5 UV inactivado genera algunas señales de muerte celular en una baja proporción de las células Reh, los linfoblastos LLA-B y las PBMCs, observando la ausencia o la muy baja proporción de apoptosis en etapa temprana, sugiriendo que el inicio de la apoptosis en estas células requiere la replicación viral.

Se ha informado que los rotavirus inducen apoptosis en células Caco-2 conduciendo a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y a la liberación del citocromo C de las mitocondrias, liberando vesículas extracelulares que expresan marcadores de cuerpos apoptóticos y exosomas (236, 237); mientras que el rotavirus induce oncosis en células MA104, donde la infección por virus afecta la integridad de la membrana celular sin inducir la fragmentación del DNA o la formación de cuerpos apoptóticos, mediante el compromiso de la homeostasis iónica del Ca^{++} en la célula hospedadora (238). Halasz P. y colaboradores describen cambios en la integridad de la monocapa del cultivo de células MA104, HT-29 y Caco-2 después de la exposición a rotavirus RRV o CRV-8, paralelamente en estas células se redujo la actividad metabólica y la viabilidad celular, induciendo externalización de fosfatidilserina en células MA104 y HT-29, y fragmentación del DNA en células Caco-2 luego de 11 h.p.i. (239) Curiosamente estos autores también reportan que la exposición de las células MA104 al rotavirus inactivado o al dsRNA del rotavirus RRV también alteraron la integridad de la monocapa del cultivo, induciendo pérdidas más tardías de la función celular que no estaban relacionadas con la apoptosis, concluyendo que la

iniciación de la apoptosis y el mecanismo de muerte celular inducido por la infección por rotavirus dependen del tipo de célula y el grado de diferenciación. Igualmente se ha reportado que las proteínas rotavirales NSP4 y NSP6 pueden afectar las funciones mitocondriales durante la infección por rotavirus (240, 241). Bhowmick R. y colaboradores muestran evidencia de la translocación de NSP4 a las mitocondrias durante la infección temprana resultando en la disipación del potencial de membrana mitocondrial durante la infección por el rotavirus y señalan que la proteína NSP4 ejerce su efecto proapoptótico al interactuar con la proteína translocadora de nucleótidos de adenina y el canal aniónico dependiente del voltaje de la mitocondria, lo que produce la disipación del potencial mitocondrial, la liberación de citocromo c de las mitocondrias y la activación de las caspasas, sugiriendo que la señal apoptótica temprana es iniciada por la expresión de NSP4 (241). Adicionalmente, la infección por el rotavirus RRV en células MA104 activó a la proteína proapoptótica Bax y lo más importante, los siRNA contra Bax inhibieron parcialmente la liberación de citocromo c en células infectadas con rotavirus RRV, sugiriendo que la disfunción mitocondrial inducida por rotavirus depende de Bax (242). Por otro lado, Bagchi P y colaboradores han demostrado que la proteína no estructural NSP1 de la cepa de rotavirus A5-16 suprime la apoptosis inducida por el virus para facilitar el crecimiento viral mediante la activación de vías de pro supervivencia como la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt y NF- κ B (factor nuclear kappaB) durante las primeras 2-8 h.p.i. en células MA104 o HT29 (76). NSP1 también modula la maquinaria apoptótica mediante la interacción con el dominio de unión al DNA de p53, dando como resultado la ubiquitinación y la degradación proteasomal de p53 (243). En conjunto estos hallazgos pueden especulativamente explicar la baja mortalidad encontrada en los linfoblastos LLA-B y la línea Reh durante las primeras 12 h.p.i. y mayores luego de este periodo.

La interacción entre los virus y sus células huésped se caracteriza por interacciones entre los receptores de la superficie celular y las proteínas estructurales del virus que facilitan la entrada. Una vez dentro de la célula huésped, muchas proteínas codificadas por virus pueden modificar los patrones de transcripción y traducción celular para favorecer la multiplicación del virus. En este sentido, quisimos estudiar la implicación de algunas proteínas de la superficie celular en la infección de los linfoblastos LLA-B y la línea celular Reh por el rotavirus Wt1-5 adaptado, en particular con las proteínas HSPs (Hsp90, 70, 60 40), Hsc70, β 3 y PDI localizadas en la membrana citoplasmática. Se ha demostrado que las proteínas Hsc70, PDI e integrina α V β 3 localizadas en la membrana citoplasmática

interactúan con proteínas estructurales de rotavirus durante el proceso de entrada en células MA104 o Caco-2 (22, 29, 31, 100). Estas proteínas celulares, además de algunas proteínas de choque térmico (HSP), también se han asociado con malignidad celular. Aquí, encontramos mediante citometría de flujo y análisis de epifluorescencia diversos niveles de expresión de las proteínas de interés en los linfoblastos LLA-B y la línea celular Reh, hallando una expresión moderada-alta de Hsp90 y Hsp70 en su superficie citoplasmática, Hsc70, PDI e integrina $\beta 3$ se expresan en niveles bajos, mientras que Hsp60 y Hsp40 están generalmente ausentes. Estos resultados nos llevaron a examinar la implicación de estas proteínas en la infección de los linfoblastos y de la línea Reh. La preincubación de las células con anticuerpos contra Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI o integrina $\beta 3$ dio como resultado una disminución de la infección viral, lo que sugiere que estas proteínas celulares participan en cierta medida en el proceso de entrada del rotavirus Wt1-5 adaptado. Dado que este tratamiento con anticuerpos en las células fue capaz de reducir aunque no por completo la infección por rotavirus, se sugiere que el rotavirus adaptado parece haberse adaptado para utilizar moléculas de superficie celular alternativas como vías de entrada, sin embargo otros mecanismos endocíticos del virus, como las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha X\beta 2$, los Gangliósidos, el Ácido Siálico, la macropinocitosis o la captación mediada por caveola no fueron probadas en este trabajo. Aquí hemos demostrado que las proteínas celulares que reaccionan con sus respectivos anticuerpos caen dentro de los tres tipos principales de proteínas de la superficie celular requeridas por la entrada en la célula huésped. Por ejemplo, la integrina $\beta 3$ es una molécula de superficie celular que media la unión del rotavirus a la célula, mientras que la entrada al rotavirus necesita actividades de chaperona y reacciones redox realizadas por HSPs/Hsc70 y PDI respectivamente (244). La cepa mejor estudiada RRV, que es sensible al tratamiento de las células con neuraminidasa (NA), usa las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$, y la proteína de choque térmico Hsc70 como receptores e ingresan en las células MA104 a través de una vía no mediada por clatrina o caveolina que depende de una dinamina funcional y de la presencia de colesterol en la superficie celular (245). Además, se ha informado que la inhibición específica de Hsp90 intracelular disminuye la infección por la cepa de rotavirus humano KU y la cepa de rotavirus de simio SA11 a través de la modulación de las proteínas de señalización celular (246). Sin embargo, la implicación de otras proteínas de la superficie celular en la entrada del rotavirus Wt1-5 en células Reh y los linfoblastos LLA-B no puede descartarse y se necesitan más estudios.

Los virus oncolíticos dependen de su tropismo específico por células neoplásicas para inducir la muerte de las células tumorales. En el presente trabajo, mostramos que el rotavirus Wt1-5 adaptado interactúa con las proteínas de superficie celular Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI y β 3, pero no con Hsp60 o Hsp40 durante los primeros 15 minutos pos infección. Probablemente, estas proteínas celulares desempeñan un papel durante los primeros pasos de la entrada de rotavirus Wt1-5 en las células Reh, ya que se observó una colocalización temprana entre las proteínas estructurales virales y algunas de las proteínas celulares estudiadas. Sin embargo, estas proteínas celulares pueden desempeñar otras funciones además de simplemente facilitar la entrada del virus. No se puede excluir que estas proteínas celulares induzcan el mecanismo intracelular que se necesita para un ciclo de vida viral exitoso. El tropismo celular y de huésped representa una de las características más relevantes de los virus y para poder replicarse necesitan una interacción coherente entre el virus y la célula huésped, que comienza con la unión del virión a los receptores de la superficie celular antes de la entrada en la célula, finalizando con la producción de nuevos viriones (247). Dentro de estos receptores las proteínas Hsc70, Hsp70, Hsp90, PDI y β 3 son reconocidas como receptores que contribuyen a la entrada de virus tales como poliomavirus, Virus de la encefalitis Japonesa, Zika virus, virus del Dengue, Influenza virus, HIV, Hepatitis virus, adenovirus y rotavirus (30, 158, 159, 190, 248-252). El requerimiento de varias moléculas celulares, necesariamente presentes y organizadas de manera precisa en la superficie celular, podría explicar el tropismo celular y tisular de estos virus, señalando la importancia de mecanismos moleculares comunes, en lugar de una molécula en particular.

La identidad genética del rotavirus Wt1-5 (genotipos G y P) mostró que este pertenece al Grupo A, con amplificación del segmento VP7 para los genogrupos G3 y G4, y con amplificación del segmento VP4 para los genogrupos P4 y P11. Este resultado puede ser debido a que el rotavirus Wt1-5 adaptado proviene de la adaptación de 5 aislamientos de rotavirus (Wt1, Wt2, Wt3, Wt4, y Wt5) aislados de heces de niños en la ciudad de Bogotá, sugiriendo que se obtuvo este perfil por reassortment genómico entre los aislamientos parentales utilizados. Sin embargo, la identidad genética de los segmentos genómicos reordenados aún debe establecerse. Justamente las características del genoma de los rotavirus, que está compuesto por once segmentos de RNA bicatenario (dsRNA) permite que la evolución y la diversidad de los rotavirus se base en la recombinación genómica, la acumulación de mutaciones puntuales, la recombinación intragénica y la transmisión

interespecie (253, 254). Al revisar la distribución de los grupos de rotavirus circulantes en Colombia durante el periodo epidemiológico en el cual se recolectaron las muestras para la purificación de los aislamientos rotavirales parentales, se encontró que en los años 2008 y 2009 los genotipos predominantes fueron G2P[6], G1P[6], G9P[6] y en menor proporción G2P[4], y que a partir de 2010 incrementó su circulación con variaciones en frecuencia hasta el 2012, donde se evidencia tendencia al descenso y aparición de genotipos G9P[8], G9P[4] y G2P[8]. A finales del 2012 emerge el genotipo G12P[8] y es el agente causal de brote de diarrea a mediados de 2013 (255). Los genotipos que nosotros reportamos son diferentes a los principalmente encontrados en estos periodos y puede estar relacionado a la selección inmunológica debida a la vacunación, al patrón de circulación de estos virus y a la tasa de mutaciones dada la naturaleza segmentada del genoma.

En general, los resultados informados aquí proporcionan evidencia sobre la capacidad oncolítica del rotavirus Wt1-5 adaptado sobre la línea celular Reh y los linfoblastos LLA-B, sugiriendo un tropismo por las células tumorales que expresan las proteínas de superficie celular Hsp90, Hsp70, Hsc70, PDI y β 3, indicando mecanismos de muerte celular mixtos (apoptosis y necrosis) relacionados con la concentración del inoculo viral, sin tener toxicidad sobre las PBMCs no tumorales. Sin embargo, además de la oncólisis directa evidenciada, todavía no conocemos si el rotavirus Wt1-5 adaptado es capaz de inducir mecanismos de muerte celular inmunogénica o si tiene posibles interacciones sinérgicas con otros tratamientos contra el cáncer. Aunque se podría anticipar la seguridad de los rotavirus como virus oncolíticos, aún se deben realizar más investigaciones para garantizar que los rotavirus cumplan con los requisitos que caracterizan a un agente oncolítico ideal.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Los Linfoblastos LLA-B son susceptibles a la infección por el rotavirus oncolítico Wt1-5 en diferente proporción para cada paciente, encontrando antígenos virales desde las 8 horas post-infección (h.p.i.) con un pico máximo luego de 24 h.p.i.
- Se observó una disminución de la viabilidad celular desde las 12 horas post-infección para las muestras de linfoblastos LLA-B que fueron susceptibles a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado.
- El rotavirus Wt1-5 genera efectos citotóxicos de forma heterogénea sobre los linfoblastos LLA-B, observando que el porcentaje de células positivas para DiOC6, 7-AAD se incrementa proporcionalmente a la MOI empleada.
- Se encontró una mayor expresión de las proteínas celulares Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, Integrina $\alpha V\beta 3$ y PDI en la membrana citoplasmática de los linfoblastos de los pacientes con un peor pronóstico.
- Los Linfoblastos LLA-B que presentan una mayor expresión de proteínas celulares Hsp90, Hsp70 y PDI en la membrana citoplasmática, presentan una mayor susceptibilidad a la infección por el rotavirus Wt1-5 adaptado.
- Las proteínas celulares Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsc70, Integrina $\alpha V\beta 3$ y PDI en la membrana citoplasmática parecen estar involucradas en el proceso de entrada del rotavirus Wt1-5 adaptado en los linfoblastos LLA-B y en la línea celular Reh.
- El rotavirus Wt1-5 adaptado pertenece al grupo A (G3, G4, P4, P11).
- El rotavirus Wt1-5 adaptado es un potencial candidato para ser utilizado como agente oncolítico.

6.2 Recomendaciones

Como los resultados descritos aquí muestran la posibilidad de usar el rotavirus Wt1-5 adaptado como agente oncolítico, es importante adelantar ensayos que determinen la eficacia y la eficiencia del rotavirus Wt1-5 como agente oncolítico. Por tanto sugerimos lo siguiente:

- Establecer diferencias comparativas en la producción partículas virales infecciosas con otras líneas celulares tumorales así como con otras cepas rotavirales de referencia.
- Desarrollar ensayos para determinar si el rotavirus Wt1-5 adaptado es capaz de inducir mecanismos de muerte celular inmunogénica.
- Evaluar posibles interacciones sinérgicas entre el rotavirus Wt1-5 adaptado con otros tratamientos contra el cáncer.
- Analizar otros mecanismos endocíticos del rotavirus, como las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha X\beta 2$, los Gangliósidos, el Ácido Siálico, la macropinocitosis o la captación mediada por caveola que no fueron evaluados en este trabajo.
- Valorar la activación de vías intracelulares que favorecen la replicación de los virus oncolíticos tales como PKR, Nf κ B, Toll-like receptor o IRF3.
- Aclarar si la interacción con las proteínas de choque térmico ocurre de manera directa o esta interacción es funcional mediante complejos con otras proteínas.
- Identificar la identidad genética de todos los segmentos genómicos de rotavirus Wt1-5.
- Basados en la evidencia actual sobre el uso del rotavirus como agente oncolítico con la que cuenta el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, es posible desarrollar estudios en modelos animales que permitan analizar aspectos como la administración sistémica o intratumoral del rotavirus y el papel de la inmunidad antiviral previa o posterior.
- Propender por el desarrollo de trabajos de medicina traslacional (basados en la necesidad clínica) en diversos tipos de cáncer, que permitan ampliar el uso del rotavirus como agente oncolítico.

A. Anexo 1:

Lista de Primer Genotipificación

<i>Primer para genotipificación</i>		
<i>Secuencia primer consenso VP7 para genotipificación G</i>		
Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición/Polaridad
9con1-L	TAGTCCTTTAATGTATGGTAT	nt 37-59/ +
VP7-Rdeg	AACTGCCACCATYTYTCC	Nt 914-33/ -

<i>Secuencia primer consenso VP4 para genotipificación P</i>		
Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición/Polaridad
Forward con3	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	nt 11-32/ +
Reverse con2	ATTCGGACCATTTATAACC	nt 868-887/ -

<i>Secuencia primer para genotipificación G</i>				
Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición/Polaridad	Tamaño del Amplicon (pb)	Genotipo
9T-1	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	nt 176-195/ -	158	G1
9T-2	GTTAGAAATGATTCTCCACT	nt 262-281/-	244	G2
9T-3	GTCCAGTTGCAGTGTAGC	nt 484-501/ -	464	G3
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	nt 689-709/-	672	G3
9T-4	GGGTCGATGAAAATTCT	nt 423-440/ -	403	G4
aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	nt 178-198	161	G8
9T-9	TATAAAGTCCATTGCAC	nt 131-147/ -	110	G9

<i>Secuencia primer para genotipificación P</i>				
Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición/Polaridad	Tamaño del Amplicon (pb)	Genotipo
1T-1	TCTACTGGATAACGTGC	nt 339 -356/-	345	P[8]
2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	nt 474-494/-	483	P[4]
pUK	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	nt 336-354	343	P[5]
3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	nt 259-278/-	267	P[6]
4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	nt 385-402/-	391	P[9]
5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	nt 575-594/-	594	P[10]
ND2	AGCGAACTACCAATCTG	nt 116- 133	122	P[11]

B. Anexo 2:

Secuencias del Wt1-5 adaptado

>Wt1-5contig_1

GCGTACAGGAAGCGGAGCTAAACGTGAAAACCTACCACAACAAAATGAACGCTGCAAGAAAAAGAAATGAAAAAGATGTGGATGTAACCTAGGAGAATAAA
 AATAACAATAGAAAAGCAGCAATTTCTGATAAAGTACTATCACAAAAAGAGGAAAATAAAGTATGCACAAGATGATTTAAAAAGCTGGTGAATTAATAATC
 ATCAAAGAAGAGTCAAACAGTTGCTGCAAAATATTAACAAACGAAAGAACCATCAGAAAGAAATACAGTATGAAATTTACAAAAACGATACCGACTTTTGAAT
 CAAAAGAATCAATTTTAAAAAATTAGAAGATATAAGACCGGAGCAAGCTAAGAAGCAATGAAATGTTTGAATATTTGAACCAAAAAAATACCAATCTATCGA
 GCAAAATGTTGAGAAAAGTGGAAATAGATGGTATTGGAATTTGAAAAAGGATACGCTGCCAGATGGAGATTATGATGACGAGAATTTTCTTAATTTATATG
 ATCAGATCCTGATAGAAATGCCAGATTATTTGCTACTGAAAGATATGGCTGTAGAAAAATAAACTCTAGAGATGCTGGTAAAGTTGATGATTCTGAAACGGCAAA
 TATTTGTGATGCTATTTCAAGATGAAGAGACAGAGGGAGTTGCAGAAGATTCATTGCAGATATGAGACACACAGTTCCAGCTGATAGAAATTTGTCATTAAT
 CCATCAATCTTACCAATTTGATCAGCATTAAATGAATTTTTCTAAATGATCAATTTAGTCGAACCACTAAATAATGAAATCTTTTATATATACCAGAAAAGAA
 TAAGGAATGATGTTAACTATATTTGAATATGGATATGAATTTGCCATCAACAGCAATATTTAGACCAAAATTTATGCAAGATAGACTAAATTTACATGATAATTT
 TGAATCATTATGGGACAATACTACATCAATATATACTAGCCAGATCAGTTGCTGATTTGAAGAAAAAGAAATAGTTTCAACTGAAGCTCAGATACAGAA
 AAATGTCTCAAGATTTGCAAGCTTAAAGCTTTAACGATACAATCTGAAACGAGTTTCTTGCTGGCATAAAATCACAAAGCAAAATGATTTGTTTTAAAACTTGATA
 GCAGCTATGTTAAGCCAGCGTACAATGTCATTAGATTTGTAACCCAGCAATATATGTCATTAATCTGGTATGTTGGCTATTGACCGTTATACCAAAATGATATGTT
 TCTTCTGTAATCATTAGTCGATCGCAATGGCCATAATAAATACTATAGTTTATCCAGCATTGGAATGCAAAAGAAATGCAATATAGAATGGTATCCCGAGACTC
 CGTTTTCAAAATAGCAGAACAGCAAAATACAAAATTTCAAGTAGCTAATTTGTTTACATTTTATTAATAAATAGATTTAGGCAAGTTGTTATTTGATGGAGTTTAAATC
 AAACACTTAACGATAATATTAGGAATGGACAAGTTAATCAGTTAATGAAGCAATTAATGCAAGCTATCTAGACAACAATTTCCGACTATGCCAGTTGATTATAAA
 AGATCAATCCAAAGGAATTAATCTATTAACAGATTAGGTCAGTTAGTTTAAACAAGATTAGTATCATATAATTTATGAACCTCTAATGGCTTGTGTAAT
 ATGAATATGCAACATGTTCAAACTCTCACTACCGAAAAATACAATTAACCTCTGTCACATCTTTATGTTAATTTGGAATACTACAGTAATCCAGTCCACAA
 ACATTTTCACTATTATAACATAAATGTAATTTTCAATTAATAACGAACGAATTAACGACGCAAGTTGCTATCATTACGGCTGCTAATAGACTAACTTATAT
 CAGAAAAAATGAAATCAATGTTGAGGATTTTTGAAAAGATTGCAAAATTTTGTATGACCCAGTACCAGTACCAGTACCAGTACCAGTACCAGTACCAGTACCAGT
 GTTATTACCAGTTGAAAAGCAGGACTTGATATATTTAATTAATTAATGAATATGGAGCAGATCGAACGAGCTTCCAGATAAAATGCTCAAGGAGTAATAATG
 CTTATAGAGATATGCAACTAGAAAGAGATGAGATGATGATATGCAACATTTGCTAGAAATCTCGATGGATATCAACAAATTAACCTAGAGGAGTTGATGAGAAC
 TGGAGACTATGGCAAAATTAATAATGTTATTAACAATCAGCCTGTAGCTTTATAGTAGGGCATTACCATTGTGACGGATTCTCAGTTATATCACTACTTTGCA
 AATTAGATGCTACAGTTTTGCTCAAAATAGTTAACTTAGAAAAGTGGACACTTTAAACCAATATTGTATAAGATAAATCTGATTCTAATGATTTCTACTTATGTC
 AAATTTGATTTGGATACCAACTCAACCAACAAAAGTCTATAAACAAAGTACCACAACCTTTTATTTTCAAGCGTCAATGCATATGTTAACGCTAATTTGACTTTTAC
 AGTTTATCTGATTTATATCTTTGCTTCTGCAGACAGGTTGAACCCATTAAACGAGTTGCTTTTGACAAT

>W1-5contig_2 reverse

complementTTTACCTGATGGTGAAGCATGAAAGTATTAGCTTTAAGACACAGTGTGGCTCAGGTGATGCAGATACTCAAACCTTTTACATGATGATTCAAAA
 GATGAGTATGAAAATGCAATTTCTCATTCTAATCTAATCTACACATAATATTTATACCTGAAATACAGCCTTAAAACTTAAAAATATTAATAAATCAGGTATAGCAG
 CAGTTGAAGTACAATCTCCAGATGAATTTTGGCTTAATAAGGTGAATTTACGTCAGGATATGAGAATAACATAGTTTATTTACATGATTTTACATTTATACTAA
 CAATGAAATAAGAAGCAGATCAACATTTGGATACTAAACTGATATAATTTGACTATCTATTACCTGGATGGAAATTAACGTATGTAGGCTATAATGAAAGAAATACAC
 GAGTCACTATAATTTTCAATTTATATGTCAAAATGCAGCTACAGATGATATAATGAAATATATACTCCAATGAGTTAGACTTTTCAAAATTTTCTGTGAG
 AAAAAATTAAGAGAGAATGACCACATCTCTCAATTTGCTAGATTATCAAAATCGTGTGTTTAGAGATAAAATTTCCATCTATTGTAACATACATAAAAAAGTAT
 AAATGTTGGGCCGAGGAATGAATCTATGTTACATTTCAAAATTTTCAAACTAATAAGCAATTTTCAACCGTGCATATTTGTAAGCATACTATTAATTTGAAGC
 AGGAGAAATGGTTGGTAAAGAGATACACAATTTGATATCGGACAATATAAAAACTATGCAATATAAATATCTCAACAGGAAAGCAAGGTTGTTGTGTTAAATTAAGTCT
 AACCTATAATACATGCTTTGGTTACGCTCCATCTTTTGGATTTTATGATATTAACAGTATTCTGATTTTACATTTGAAACATGGGATCCATAGATACTCCGTT
 CTACAACACATATAAAGAATTTTTTGTAAAGGATGCAATAAGCTTAAAGATAATTCAGTTTATATAGACATAAGAAGTATGATGAGGTAATATGGATTTGGA
 AAGAGTTGGAGAAAATGTAAGAACACAAACTGTTAGCAATTTGCAATATAAATATCTAACAACAGGAAAGCAAGGTTGTTGTGTTAAATTAAGTCT
 ATGGACCTAGAATTAACAAATACAGCAAAATTAATCTCATCACTCAACTACTGAAGTTAGATCAGAAATTTTATGCAATTTGGATGATGGGATATTTACCATTAAA
 AGATTTATACCAAAAGGTGATTTTATGCTTTTATAAACAATGTAACACAGAAATGTTTATAAATAAATGGAAGTACAAATATGATAAATGCAATTTGCAATAT
 GGCATTTGATGCTTTTATCCAATGACTTCAATTTCAAGGCAAGATGTTAATTTGATTAATAAACAACAAATCACTCACTATTGCTGTTGTTAAATTAAGTCT
 AGACGAAACAAAAGTAAATTTTAAAAATATTTATGATTTGAGCCTTTCTGCCAACAGATTTGCAACTTTAAAGATTTGATAAATTTACATATATGATGGTTGTTAGGCA
 ATTTCCGATTTCAATATCTTTATCGTCTAAACCCACCGAAATAATCATTTTATATAAATAAATGGAAGTACAAATATGATAAATGCAATTTGCAATAT
 GGGCTTTTCTAGAAGATCGCATCAAAATAGATTTCTCAGAGTCTCGACATCATATTTCCGGATATATTTTTAGAGATCTTTCAAAATGAAATTTCAATCAATAGGTAC
 TAATGTGAGAAATTCAGTTTTCAGGACATGCTATAATGCAATGATTTACTACAGATATAAATTTAGCCTTTGATCTTTAAAGATGAGATTTATCTACATCAATTTGAAA
 ATCGCTGTAGAAGTGGAAAGATATTAAGACATGCACCAATCGAATTTGATATGCAATGCAAGTAAAGAAATTTGCTATATTAACAAGATGACTTTAACGGTA
 TTGAGATACGCTAATGAAATTTGAAGGGTATATAAACAAGTATATAGTTATAACCTATGCTGACGATCCCAATTTACTTTATAGGAATTTAAATTAAGTATACCTTAT
 GAATACGATTTAAATTTCCACATTTGACACTAGGAGTATTTATATCTGATAATGATACATGATGTAATCACAGTCTGAAGAAAATGAAGCAGAGCTATTT
 AAAATGGAATTTAGTACTTATACCTATCTGATAATACGATGTAGCAATGCTAGTGGTGTGTTTCAACTTTTAAAAATATAATATATATGTTCTATA
 GAAATCATATCAGCTTTGAGACAATCAGGAATGTTTATCCACACATTACGCTTTAGTTTTCAGCAACAACAGACGGTTAGAATAGAAAGTACAAAACCTCAGAATCAAT
 TCAATTTACTTAAGAAAGAT

>Wt1-5contig_3 reverse

complementTCATATTACCATATGAATACTTTATTGCGCAGCAGCTGTCGTGAGAAAAATGTTATCATACGCAAGCATACTAGAGAGTACGCAGAAATTTACTCGC
 AGTCAAAATCAATGCTATCATATGGTGTGTTACAAGATTCTTATCCAGTAAATCTATGGTATTATACACAGACGTTTCAATGGGATTCATCACAACTAACACAC
 AGCCATTTAGAAAAGGAATAAATATGGGTTTAGATATGTTATCCAAATGACTAATGATCCAAAAGTAGTACAAAACGCTAAATTTATATAAACAACACAAAATTAATC
 TCATGGATTCATACGTTCAAAATACCTGATGGTAAATGTAATCAAAAAGATTCAGTATGGTGTGTTGCTTCAGGAGAAAAACAACTAAGCGAGCTAATTTCTATAGCT
 AACCTAGCACTCATAAAACGGTATTGTCAAGGATTGCAAAATAGTATTCTTTTATAACCAAAAATTAATCAGAGTCGATGGTATGATAAATATGCAGTGTCAAAATTT
 AACACCGATGTCAACCAAAATGGTCCAAAGATGTGCAAAACGATGTGAGATATATATTTAGAAATGAATGCTAAAGTTAAAGCATTGGATCTACAGTCCGAT
 TGAATAGCAAAAAGATATATAGCAGGAGGAAAAATATTTTTCAGAGCTGGTATAAACTTATTAATAATGAGAAAACGTTGGGCAAGTACACAATGGGATCAAGCA
 GCTATTTTATTAACAATCATTGTTAACAAATACGAGGATTTGAGACTGTAGAGAATTTTATTAACATAAATTTATCAAAATGACATCTGTAGCCATTACTGTA
 CTAAGGTTATTTCCGTCAGAACAGAGTGTAACTACTAATTTCTACATTTCAAAATTTTGAAGTCTGAAAGATTTTCAATATAGAATATGGGCAACCAATGAAAT
 ATATATACAAAAGACATTTATGTCAGTGTCTAGTCAAAAGTCAAGAAATAGCTGATGAAATAGCTTTTCAACAACATTTAAAAATTTATGTTAACAAATATCTGACCA
 ATTTAATATCGAAAACCGTAATTTGATCCAAAGGATAGCTGTAACAGAAAAGGCGAAATTTGAATTCATATGCACCAGTTTATTTAGAAAACCGTCTGCGCAAA
 TATCAGCGTTAATTAATGATGTCAGAAAACCGTGTCAATTTAAATCAAAATTAATTAATTAATGACATTTGCTGACGATCCCAATTTACTTTATAGAAATATGGGCAACCAATGAAAT
 TAATTTGCCAATTTCAATACAGAAAATTTATGCCAACACTACCTAATAATGTCCAATATGTTATACAATGCAATAGGATCGAGGACGTATCAAAATAGAAGATAGTGGG
 CAAAATCATCGATTTCAAGTTAATATCAAAATTTCAAGTTTCAAAACCTCAGATTTGAAGAATATATAAAGTTATATCTTTAAGAGAACAGAAAATACAGTTGATTT
 AGTTTCTTAGGAGTTTCCACAGTTGATGCAAGCAGCTACGTTGGGTCGAAGTATATTCGAGGATAAGTATAAATAATGAAATCTTACGCTTACGATATAAATTTAT
 CAATTAATTTAGGATGTTTCAACTATCAATTTTAACTCTCAGATTTAGAGAACTTTATACGAAATTTCTTTTAAAGGCAAGATACCAGCGTAAACATTTATATTGCA
 TCTTTATGTAACCTTTGAAATATAAATATGCTATTAAGAATGGAGCTTTGGATTTGATTTTGAAGTACCCAAAATCTGAAATGATTAATTTGGAAGAAAAT
 GTGGCAATTAACAGCTATACCTCCCTACACTAGTCCGCAACTTTCTTCAAGATTAGA

>Wt1-5contig_4 reverse

```
complementCTTTTAAAGACGCTTGTATTATTATAAAAAGAATTAATAAATTGAATCATGCAGTCTTAAAAATTAGGAGTTAATGATACATGGAGACCGTCACCTCCAAC
TAAGTATAAAGGATGGTGGCTTGGATTGCTGCAACATACTGATTTAACTTATTGTAGAGGTTGTACCATGTATCATGTTTTGCAATGGGTAGTCAATATGGTAGAT
GCTTTCTTGATGATGAACCACATTTATTAAGGATGAGAACTTTTAAAAATGAAATAACAAAAGATGATTTGAAGAATTTAATTGATATGTATAGCACATTTCCCTA
TGAATCAGAAAATAGTATGTAATTCATTAATAATACGAAACAACACAAATGTAGAAAATGAATGTATGACGCAGTGGTATAATCACTTACTAATGCCAATAACCGTTA
CAATCTCTATCAATTGAATTAGACGGTGTATGTTTATTACGATTTTGGGTATTATGATAATATGAATAGTGTAAATCAAACTCCATTTTCATTTACAAAATTTAATAGATA
TGTATGATAAAATTACTTGTATGATGTAATTTTCGTTAGAATGTCATTTACCAACATCTTTACAACAAGAATATGCAATTAGATATTTTTCTAAATCAAGGTTTAT
TAGCGAACAGAGGAAATGCGTTAATGATTCACACTTTTCAATTAATGTATTAGAGAATTTACATAATCCAAGTTTCAAAGTACAGATTACACGTAACGTAGTGAAC
TGCTTCTTGGCTGGAATGAAGCATGCAAGCTCGTTAAAAATGTCAGTGCTTATTTTATGATGCTGAAAAACATCACGTATTGAATTTTATAGTGTCTTACTAGATGT
AGAATATTCACACAACATAAACTCAAAATGGCATCTAAGCTAATCAAACCAAAATATATAACCTCGAATCATAGAACATCAGCTACTGAAGTACACAATTGCAAGTG
GTGTTCAAGTAAATAAGTTATACTGTATGGAATGATTTTAGAGTAAAGAAAATATATGATAATTTTTAGTTTTCTACGAGCTTTAGTTAAGTCAAAATGTTAATATC
GGACATTGTTTCATCACAGGAAAAGATATATGAATATGTTGAAGATGTTCTGAATGTGTGATAATGAAAAATGGAAAAACGTCAATAATGAAAGTTTTTAAATGTCT
AGAACCAGTAGAGCTTGATAATGCAAGTATGTTTTATTAACCATGAAATAAATGGGATGTTATTAATGTATTGGTTCAGAGCATTGGTAAAGTACCACAAATATT
AACTTTGAAAAATGTTATTACAAATCATACAATCTATTATATGAATGGTTTGTATATAAGATACATGAGGAATACACCAATGGTTACATTTACAATTGATAAATTAAGA
CGATTGCATACAGAATTAAGACTGCTGAATATGATTCTGGTATATCTGATGTTG
```

>Wt1-5contig_6

```
CAATTTACTGATTTTGTATCATTGAATCACTACGATTTAGATTTAGTTTTGACAGTTGATGAACCACCTTTCTCAATATTGAGAACACGTACAGTGAATTTGTACGGA
TTACCAGCGCTAATCCAATAATGGAATGAATACTACGAAATATCAGGAAGGTTTTCACTCATTTATTAGTTCCAATGATGATTATCAGACTCCAATTATG
AATTCAGTGACAGTAAGACAAGATTTAGAGCGCCAACCTACTGATTTGCGAGAAGAATTTAACTCATTGTCACAAGAAATAGCTATGGCACAATTTGATTGATTAGC
ACTGTTGCCTCTAGATATGTTTTCCATGTTTTCAGGAATTAAGGTACAATTTGATTTAACTAAATCAATGGCGACTAGTGTAAATGAAGAAATTTAGAAAAATCAAAAT
AGCTACATCAATTTCAGAAATGACTAATTCATTGTCAGATGCTGCTTCATCAGCATCAAGAAACGTTTCTATTAGATCGAATTTATCTGCGATCTCAAATTTGGACTA
ATGTTTCAAATGATGTGTCAAACGTAACATAATTCATTGAACGATATTTCAACACAACAGTCTACAATTAGTAAGAAACTTAGATTTAAAGAAATGATTACTCAAACGT
AAGGAATGAGCTTTGACGACATTTTACGACAGCTGTAATAAAAACAAAATAGATATGCTACTCAAATTTGGAAAAATACTTTACCTGACATAGTTACAGAGGCATCT
GAGAAATTTATCCAAAACGATCATATCGAATATTAAGGATGATGAAGTAAATGAAATTAATCTGAAGAAAATTTCTTTGCATACAAAATTAATACATTTGATGAA
GTGCCATTCGATGTAATAAATTCGCTGAACAGTAAACAGATTTCCAGTTATATCAGCGATAATCGATTTTAAAGACATTTGAAAAATTTAAATGATAAATTTGGAATC
ACTCGTACAGAAGCGTTAAATTTAAATTAATCGAATCCAATATGTTGCGTAATTTCAATTAATCAAAAATCAATCCAATTTAAGGAATAGAATTTGAACAGTTAATACTA
CAATGTAATTTGTGAGAACGC
```

>Wt1-5contig_7 reverse

```
complementATGGAGTCTACTCAGCAGATGGTAAGCTCCATTATTAACACTTCTTTTGAAGCTGCAGTTGTTGCTGCCACTTCAACATTAGAATTAATGGGTATTCAA
TACGATTACAATGAAGTATTTACTAGAGTTAAAAGTAAATTTGATTATGTGATGGATGACTCTGGTGTAAAAACAATCTTTTGGGTAAAGCTATAACTATTGATCAG
GCGTTAAATGGAAGTTTGGCTCAGCTATTAGAAAATAGAAATGGATGACTGATTTAAAAACGGTTGCTAAACTAGATGAAGACGTGAATAAACTTAGAATGACAT
TATCTTCTAAAGGAATCGACCAAAAGATGAGAGTACTTAATGCTTTTGTAGTAAAAAGAATACCAGGAAAATCATCATCAATAATTAATGCAGTACTGATTTATG
AAGGATAAAATAGAACGTGGGGAAAGTTGAGGTTGATGATTCATATGTTGATGAGAAAATGGAATTTGATGACTATTGATTGGAATCTCGTTATGATCAGTTAGAAA
AAAGATTTGAGGCACTAAAACAAGAGTTAATGAAAATATAATCTTGGGTACAAAAGCAAAAGAAATGAAAATATGACTCTCTCAGAATGTCAATTTCA
CAACAGCAAAAACCAATATCAGATCTTCAACAATATTGTAATAAATTTGAAAGCTGATTTGCAAGGCAAAATTTAGTTCATTAGTGTATCAGTTGAGTGGTATCTAAG
ATCTATGGAATACCAGATGATGTAAGAATGATTTGAACAGCAATTAATTCATTTGATTTAATTAATCCATTAAATGCTATAGATGATATCGAATCGTTGATTAG
AAATTTAATCAAGATTATGACAGAACGTTTTAATGTTAAAAGGACTTTTGAAGCAATGCAACTATGAATATGCATATGAGTAGTCACATAATAAAAATATTGACC
ATCTACACATGACCTCTATGAGCACAATAGTTAAAAGCTAACACTGTCAAAAACCTAAATGGCTATA
```


KT694940.1
VP2_NaRotavirus
VP1-Scotig_1
VP2_Y9Rotavirus
VP2_OSURotavirus
VP2_RRVRotavirus
VP2_69Rotavirus
VP2_UKRotavirus

TGATGGAGGTTAAATCAACACCTAA-GATAAATATAGAAATGGACAGTATAATCA
TGATGGAGGTTAAATCAACACCTAA-GATAAATATAGAAATGGACAGTATAATCA
TGATGGAGGTTAAATCAACACCTAA-GATAAATATAGAAATGGACAGTATAATCA

gTTAATGGAAAGCTTAATGGACATCTAGACACCAATTTCCgACTATCCCGTGGATTA
gTTAATGGAAAGCTTAATGGACATCTAGACACCAATTTCCgACTATCCCGTGGATTA
gTTAATGGAAAGCTTAATGGACATCTAGACACCAATTTCCgACTATCCCGTGGATTA

TAAAGATCAATCCAAAGGGAATTAACCTATATCCAAAGATAGGTCgTAGTTFGA
TAAAGATCAATCCAAAGGGAATTAACCTATATCCAAAGATAGGTCgTAGTTFGA
TAAAGATCAATCCAAAGGGAATTAACCTATATCCAAAGATAGGTCgTAGTTFGA

TTTAAACAAAGATgTATCATATAATATGAAACTCTAATGGCTGTgTAAcATGAATAT
TTTAAACAAAGATgTATCATATAATATGAAACTCTAATGGCTGTgTAAcATGAATAT
TTTAAACAAAGATgTATCATATAATATGAAACTCTAATGGCTGTgTAAcATGAATAT

GCACATGTCACAACTCTCACTCCGAAAATTAACAATTAACCTCTGACATCTTTAG
GCACATGTCACAACTCTCACTCCGAAAATTAACAATTAACCTCTGACATCTTTAG
GCACATGTCACAACTCTCACTCCGAAAATTAACAATTAACCTCTGACATCTTTAG

TATGTAAATGGAAATCTACAGTAAATCCAAAGCTCACAAACATTTTCACTATATAA
TATGTAAATGGAAATCTACAGTAAATCCAAAGCTCACAAACATTTTCACTATATAA
TATGTAAATGGAAATCTACAGTAAATCCAAAGCTCACAAACATTTTCACTATATAA

EaTAAATGAAATTTTCATCAAAATATAACGAAGCAATTAACGCAGCTGCCTATCAT
EaTAAATGAAATTTTCATCAAAATATAACGAAGCAATTAACGCAGCTGCCTATCAT
EaTAAATGAAATTTTCATCAAAATATAACGAAGCAATTAACGCAGCTGCCTATCAT

TAGgGCCTCCTAATAGACATAACTATATCAGAAAATAAGAACTAATGATGGA-GATT
TAGgGCCTCCTAATAGACATAACTATATCAGAAAATAAGAACTAATGATGGA-GATT
TAGgGCCTCCTAATAGACATAACTATATCAGAAAATAAGAACTAATGATGGA-GATT

TTTTGAAAGATTgCAAAATTTTGATGACCCGAGTACAGATGA-CAAAATGACAGTfT
TTTTGAAAGATTgCAAAATTTTGATGACCCGAGTACAGATGA-CAAAATGACAGTfT
TTTTGAAAGATTgCAAAATTTTGATGACCCGAGTACAGATGA-CAAAATGACAGTfT

GAGGATAGACTTAgCTTATTACAGTTGAAAGACGAAGCTTGATATTTAAATTAAT
GAGGATAGACTTAgCTTATTACAGTTGAAAGACGAAGCTTGATATTTAAATTAAT
GAGGATAGACTTAgCTTATTACAGTTGAAAGACGAAGCTTGATATTTAAATTAAT

ATTAATGAAATGGAGCAGATGAAAGGCTTCAGATAAAATTTGCTCAAGGGATAAAT
ATTAATGAAATGGAGCAGATGAAAGGCTTCAGATAAAATTTGCTCAAGGGATAAAT
ATTAATGAAATGGAGCAGATGAAAGGCTTCAGATAAAATTTGCTCAAGGGATAAAT

KT694940.1
VP2_NaRotavirus
VP1-Scotig_1
VP2_Y9Rotavirus
VP2_OSURotavirus
VP2_RRVRotavirus
VP2_69Rotavirus
VP2_UKRotavirus

AAATCT-GATGGATCAACAAATTAACCAGTAGAGGTTGATGAGAACCTGGACATATG
AAATCT-GATGGATCAACAAATTAACCAGTAGAGGTTGATGAGAACCTGGACATATG
AAATCT-GATGGATCAACAAATTAACCAGTAGAGGTTGATGAGAACCTGGACATATG

GCAAATTAATAATG-TATTAACAAATCAGCCGTAGCTTTAGTAGG-GCATTACCAT
GCAAATTAATAATG-TATTAACAAATCAGCCGTAGCTTTAGTAGG-GCATTACCAT
GCAAATTAATAATG-TATTAACAAATCAGCCGTAGCTTTAGTAGG-GCATTACCAT

TGTgACgGtTC-TCAGTTATATCACTCATTGCAAAATAGATGCTACAGTTTTGCTCA
TGTgACgGtTC-TCAGTTATATCACTCATTGCAAAATAGATGCTACAGTTTTGCTCA
TGTgACgGtTC-TCAGTTATATCACTCATTGCAAAATAGATGCTACAGTTTTGCTCA

AATAGTTAAACTTAG-AAAGTGGACCTTTAAACCAATATGATATAAATAAATCTGTA
AATAGTTAAACTTAG-AAAGTGGACCTTTAAACCAATATGATATAAATAAATCTGTA
AATAGTTAAACTTAG-AAAGTGGACCTTTAAACCAATATGATATAAATAAATCTGTA

TTCATGATTTCTACT-TAGTTGCAAAATTAATGGATGACCACTTCACCAAAAAGT
TTCATGATTTCTACT-TAGTTGCAAAATTAATGGATGACCACTTCACCAAAAAGT
TTCATGATTTCTACT-TAGTTGCAAAATTAATGGATGACCACTTCACCAAAAAGT

CTATAAACAGTACCACAACTTTTGATTCAGAGGCTCAATGCATATGTTAACTCTAA
CTATAAACAGTACCACAACTTTTGATTCAGAGGCTCAATGCATATGTTAACTCTAA
CTATAAACAGTACCACAACTTTTGATTCAGAGGCTCAATGCATATGTTAACTCTAA

T-TGACTTTTAC-GTTTATTCGAAATTAAT-CTTGGTTCCTGAGACAGCTTGAACC
T-TGACTTTTAC-GTTTATTCGAAATTAAT-CTTGGTTCCTGAGACAGCTTGAACC
T-TGACTTTTAC-GTTTATTCGAAATTAAT-CTTGGTTCCTGAGACAGCTTGAACC

CATTACCCGAGTTCCTTTGCAAAATATGGCCATATGAAAGCACTGAAAGCCCAACCC
CATTACCCGAGTTCCTTTGCAAAATATGGCCATATGAAAGCACTGAAAGCCCAACCC
CATTACCCGAGTTCCTTTGCAAAATATGGCCATATGAAAGCACTGAAAGCCCAACCC

KT694940.1
VP2_NaRotavirus
VP1-Scotig_1
VP2_Y9Rotavirus
VP2_OSURotavirus
VP2_RRVRotavirus
VP2_69Rotavirus
VP2_UKRotavirus

ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC

ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC
ACTGTGGAGATGACC

>Wt1-5contig_4 (NSP1)

NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
GGCTTTTTT - TGA AAAAGTCTGTGTT - AGCCATGGC - AAC - TTTAA - GA - GCTTGT - TC
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
ATATAGAGGGTTAcaaaTaAacagagaltTcTgTgAaTGGGcaAAATccgatAT
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
GGACTCCAGTCTCTCgAAATAAAtaaaatTAAAGGcTGGTGCATcAGTGTGTCAAt
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
taAGTGGTgTgACTTcTTGcaGGAGTTEgcTgcTcATGTTTTGTCcTGGTtGtCc
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
AAaacaacGTGTTCTcTgCaAAAGCCATCTTAAAbTcAGCAACTTTTgAA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
CTCCAAACcAGAGaAAATTAAGcATcTAAATcTATgAaattTATTCaA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
TtAAATcggggTtaTcAATAAATTAaaaAAcaaaAAGcagAAATGTAGAAATG
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
AgTttgacbaatcAGGTAAATcAgTAcTCTcCAATcATcTTAAAgTcTgCAAtt
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
TcaAgTtTcTcaagGATG - TATgTtTJGGATTTATGAAgcatcaccAT
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
GcATAgATGg - CCATcAaAg - TTgAAATGcATcGATcTATGATAAAcT
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
AATGtTgATcAAGTAAATTCAGAGATGTCcTTCACCAAAATcTcAGCAAGa
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aTctATtTcCAgATTTcTcCa - - - - - cAGAAcTTgatTAAT - AAGTcAaagA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
cTAAagTcGctagtcttcaagAattcTAcTGA - ATcATcctgggatctcaaaCTgat
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
TcActCATG - AcTgTAAgATA - - - - - agATaAaattcttgcGg
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
ATtaTcAAcAcTAt - caTAAaAcAAATtTGAa - - - - - CACtGtTTAAATctgggg
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
WAbTaAaGcTgTgctttttgaaactggacatcactcCAAAcCAAAATTA - ctctCATC
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aaATCATgpcAcCAGcATcAaAAATctcAAgTAAATGGTGTaatGaaAAATgpc
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aTTCagagacTGGATGg - - - - - AAgTggaatcAAATgTAcATgAcTTTaaGCTTTA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
TcCAAtCTTgctAAaagAATGTAATcTgAGCAATGtagTcTCAaaGAAAgctT
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
ATcAtcATgTT - AAGATATcT - - - - - TGGcATcATtTcGAAATAGATgag - - - - -
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aaCTGTgAGAAATgTTTTAAATcAAcgaatcCAGTcAgTAAATgAacagcagTAA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
A - CTAT - TGATgATgAAATTCAGAGATGTCcTTCACCAAAATcTcAGCAAGa
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aaCTGTgAGAAATgTTTTAAATcAAcgaatcCAGTcAgTAAATgAacagcagTAA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
A - CTAT - TGATgATgAAATTCAGAGATGTCcTTCACCAAAATcTcAGCAAGa

NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
cTATGCAaaAaATA - TTc - - - - - AAAT - AAGtagactTcctTcaATGAAcT - Aaa - GcA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aTctATtTcCAgATTTcTcCa - - - - - cAGAAcTTgatTAAT - AAGTcAaagA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
cTAAagTcGctagtcttcaagAattcTAcTGA - ATcATcctgggatctcaaaCTgat
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
TcActCATG - AcTgTAAgATA - - - - - agATaAaattcttgcGg
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
ATtaTcAAcAcTAt - caTAAaAcAAATtTGAa - - - - - CACtGtTTAAATctgggg
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
WAbTaAaGcTgTgctttttgaaactggacatcactcCAAAcCAAAATTA - ctctCATC
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aaATCATgpcAcCAGcATcAaAAATctcAAgTAAATGGTGTaatGaaAAATgpc
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aTTCagagacTGGATGg - - - - - AAgTggaatcAAATgTAcATgAcTTTaaGCTTTA
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
TcCAAtCTTgctAAaagAATGTAATcTgAGCAATGtagTcTCAaaGAAAgctT
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
ATcAtcATgTT - AAGATATcT - - - - - TGGcATcATtTcGAAATAGATgag - - - - -
...
NSP1.RRVRotavirus
NSP1.UKRotavirus
NSP1.69RRotavirus
NSP1.YMRotavirus
NSP1.OsuRotavirus
Wt1-5contig_4
NSP1.WaRotavirus
KT694945.1
aaCTGTgAGAAATgTTTTAAATcAAcgaatcCAGTcAgTAAATgAacagcagTAA

NSP1.RRVRotavirus aAaGTTcTgTTggc----AAATAgATaTcGcAttaTATatgcacATTAA--aAtgaTAc
 NSP1.UKRotavirus TATGTgcTATTggAcTATGAAGTgAAc-TGGGAaGTgAgaggatTAgTtATgCAGAGTAT
 NSP1.69MRotavirus TATGTTTTgTTgAAttATGAAATAAAT-TGGaATGTTATgAATGTATTAATTAAtAGTAT
 NSP1.YMRotavirus TATGTTcTgcTTAAtCATGAAGTgAAc-TGGGATGTTgcTAAcGTATTAAITCAaAaTAT
 NSP1.OsuRotavirus TATGTTTTATTTAAtCATGAggTAAAT-TGGGATGTTATcAATGTATTAgTcCAGAGTAT
 Wt1-5contig_4 TATGTTTTATTAAcCATGAAATAAAT-TGGGATGTTATTAATGTATTggTTCAGAGcAT
 NSP1.WaRotavirus TATGTTTTATTAAcCATGAAATAAAT-TGGGATGTTATTAATGTATTggTTCAGAGcAT
 KT694945.1 TATGTTTTATTAAcCATGAAATAAAT-TGGGATGTTATTAATGTATTggTTCAGAGcAT

NSP1.RRVRotavirus ---TGGaAAccgaggctcTtCCAtttActTTcAcAaTTGAATcAgtTcAaTtCtAtaATta
 NSP1.UKRotavirus ggaTGGaAAA-----GTACCAagAAATtTgAacaTagATGATacaAagAagATatTaa
 NSP1.69MRotavirus ---cGGTAAA-----aTACCAaAAATATTgACTcTGAATGAcGTTATTtCAATttTAC
 NSP1.YMRotavirus ---TGGgAAA-----aTtCCACAAATAcTgACTcTGAATGATGTTATaACAgcCtTgC
 NSP1.OsuRotavirus ---TGGTAAA-----GTACCACAAATATTAACTTTGAATGATGTTAcCAATCATgC
 Wt1-5contig_4 ---TGGTAAA-----GTACCACAAATATTAACTTTGAaAaATGTATTACAAATCATAC
 NSP1.WaRotavirus ---TGGTAAA-----GTACCACAAATATTAACTTTGAaAaATGTATTACAAATCATAC
 KT694945.1 ---TGGTAAA-----GTACCACAAATATTAACTTTGAaAaATGTATTACAAATCATAC

NSP1.RRVRotavirus AAgggATTgTgAaccAATGGTgTGATgTt-GcTgAAtTAGAtcAcTtgCCgtTatgcAc-
 NSP1.UKRotavirus gtaCaATaATATtTgAtTGGTTTTGAcgTAAGATACATGAGa-gAaAcgCCAATGACgAcG
 NSP1.69MRotavirus gtataATaATATATGAtTGGTTTTGATATAAGgTttATGAGa-AACACgCCAATGACTACg
 NSP1.YMRotavirus AtTCTATgATtTAcGAtTGGTTTTGATATcAgTAtATGAGa-AACACACCAAcGACTACg
 NSP1.OsuRotavirus AATCTATcATATATGAATGGTTCGAcActaAATAtATGAGa-AACACACCAATGACTACa
 Wt1-5contig_4 AATCTATTATATATGAATGGTTTTGATATAAGATACATGAGg-AAtACACCAATGgtTACa
 NSP1.WaRotavirus AATCTATTATATATGAATGGTTTTGATATAAGATACATGAGg-AAtACACCAATgtTACa
 KT694945.1 AATCTATTATATATGAATGGTTTTGATATAAGATACATGAGg-AAtACACCAATgtTACa

NSP1.RRVRotavirus TgaACAgacTgATgcATTggttaaATTGgAagaGAAggAAACTatCTGaaGAATATGA
 NSP1.UKRotavirus TcaACAA-cgaATcAgcTtAGaAcAcTgAATaaAaggaatgAGCTcAtaGAtGATAcGA
 NSP1.69MRotavirus TTcACAg-TcaATAAATTgAagCaATTatATgAaAaggaTAAa---ACTGCaGAATATGA
 NSP1.YMRotavirus TTTACAg-TTGAcAAATTAAGACaAcTgTgCAagAaggAAG---AtTGCTGAtTAcGA
 NSP1.OsuRotavirus TTTACAg-TTGATAAAcTAAGACGAcTgTgcACAGATcgaAAG---ACTGTGAcTATGA
 Wt1-5contig_4 TTTACAA-TTGATAAATTAAAGACGATTGCATACAGAATtAAAG---ACTGCTGAATATGA
 NSP1.WaRotavirus TTTACAA-TTGATAAATTAAAGACGATTGCATACAGAATtAAAG---ACTGCTGAATATGA
 KT694945.1 TTTACAA-TTGATAAATTAAAGACGATTGCATACAGAATtAAAG---ACTGCTGAATATGA

NSP1.RRVRotavirus gcTTCTGaTcTcggacTCTGAaBaTGacgactAATgATTGAAttAActatcaccacagtt
 NSP1.UKRotavirus --cTtaGaacT---tTcAGATGTTG-----AATAA-----
 NSP1.69MRotavirus --TTCaGGTAT---ATCcGATGTTG-----AATAATtTcAGAgA-----AATtAtg
 NSP1.YMRotavirus --cTcGGTcT---ATCTGATGTTG-----AgTAATTGAAGAAA-----GATCACA
 NSP1.OsuRotavirus --TTcGGTAT---ATCTGATGTTG-----AATAATgGAAGAAA-----GgTCACA
 Wt1-5contig_4 --TTCTGGTAT---ATCTGATGTTG-----
 NSP1.WaRotavirus --TTCTGGTAT---ATCTGATGTTG-----AATAgTaaAAGAAA-----GgTCACA
 KT694945.1 --TTCTGGTAT---ATCTGATGTTG-----AATAgTaaAAGAAA-----GgTCACA

NSP1.RRVRotavirus TTTGCCAtCACAGACTcttCTGgACTAGAGTAGCGCCTAGcCAGCAaAAAcTGTGACC-
 NSP1.UKRotavirus -----
 NSP1.69MRotavirus TTcGCCACCAcAgACTcTCTGcACTAGAGTAGCGCCTAGGCAGCAATAAAATGTGACC--
 NSP1.YMRotavirus TTTGCCACCACAgACTCCCTGcACTAGAGTAGCGCCTAGGCAGCAATAAAATGTGACC-
 NSP1.OsuRotavirus TTTGCCACCACAgACTCCCTGcACTAGAGTAGCGCCTAGGCAGCAATAAAATGTGAaCc
 Wt1-5contig_4 -----
 NSP1.WaRotavirus TTTGCCAcTCAAgACTCCCTGtACTAGAGTAGC-----
 KT694945.1 TTTGCCAcTCAAgACTCCCTGtACTAGAGTAGCGCCTAGGCAGCAATgAATGTGACC-

>Wt1-5contig_7 (NSP3)

NSP3_69HRotavirusATGCTCAAGATGGAGTCTACGCAAGATGGccgt	NSP3_69HRotavirus	AAATCATCATC-AT-ATTAATGCGC-aa-attTgATCgtGATAAA-TT-GMAGGTGG-GA
NSP3_RRVRotavirus	GGG-aTTTAAATGCTTTTCAGTGGTTCGCTCAAGATGGAGTCTACTCAGCAGATGGcttc	NSP3_RRVRotavirus	AAATCATCATC-AT-ATTAATGCGC-aa-attTgATCgtGATAAA-TT-GMAGGTGG-GA
NSP3_UKRotavirusATGCTCAAGATGGAGTCTACTCAGCAGATGGGAG	NSP3_UKRotavirus	AAATCATCATC-AT-ATTAATGCGC-aa-attTgATCgtGATAAA-TT-GMAGGTGG-GA
NSP3_WaRotavirusGTTGCTGCTCAAGATGGAGTCTACTCAGCAGATGGTAAG	NSP3_WaRotavirus	AAATCATCATC-AT-ATTAATGCGC-aa-attTgATCgtGATAAA-TT-GMAGGTGG-GA
Wt1-5contig_7ATGGATGCTACTCAGCAGATGGTAAG	Wt1-5contig_7	AAATCATCATC-AT-ATTAATGCGC-aa-attTgATCgtGATAAA-TT-GMAGGTGG-GA
AF190170.1	GGCTTTTAAATGCTTTTCAGTGGTTCGCTCAAGATGGAGTCTACTCAGCAGATGGTAAG	AF190170.1	AAATCATCATC-AT-ATTAATGCGC-aa-attTgATCgtGATAAA-TT-GMAGGTGG-GA
NSP3_YMRotavirus	GGCTTTTAAATGCTTTTCAGTGGTTCGCTCAAGATGGAGTCTACTCAGCAGATGGTAAG	NSP3_YMRotavirus	AAATCATCATC-AT-ATTAATGCGC-aa-attTgATCgtGATAAA-TT-GMAGGTGG-GA
NSP3_OSURotavirusTGGTGTATGCTCAAGATGGAGTCTACTCAGCAGATGGTAAG	NSP3_OSURotavirus	AAATCATCATC-AT-ATTAATGCGC-aa-attTgATCgtGATAAA-TT-GMAGGTGG-GA
NSP3_69HRotavirus	ETC-aATTATAACCTCTCTTTGAAGCTGAGTGTgGCTGC aAcTCAGcttctGaa	NSP3_69HRotavirus	AGTTGAAGTgATGATTCATTGTGgATGA-AAAAATGGAAgTgAATC-ATTGA-TGGAA
NSP3_RRVRotavirus	tCT-ATTATAACCTCTCTTTGAAGCTGAGTGTgGCTGC aAcTCAGcttctGaa	NSP3_RRVRotavirus	AGTTGAAGTgATGATTCATTGTGgATGA-AAAAATGGAAgTgAATC-ATTGA-TGGAA
NSP3_UKRotavirus	tCT-ATTATAACCTCTCTTTGAAGCTGAGTGTgGCTGC aAcTCAGcttctGaa	NSP3_UKRotavirus	AGTTGAAGTgATGATTCATTGTGgATGA-AAAAATGGAAgTgAATC-ATTGA-TGGAA
NSP3_WaRotavirus	CTCCATTATAACCTCTCTTTGAAGCTGAGTGTgGCTGC aAcTCAGcttctGaa	NSP3_WaRotavirus	AGTTGAAGTgATGATTCATTGTGgATGA-AAAAATGGAAgTgAATC-ATTGA-TGGAA
Wt1-5contig_7	CTCCATTATAACCTCTCTTTGAAGCTGAGTGTgGCTGC aAcTCAGcttctGaa	Wt1-5contig_7	AGTTGAAGTgATGATTCATTGTGgATGA-AAAAATGGAAgTgAATC-ATTGA-TGGAA
AF190170.1	ETCCATTATAACCTCTCTTTGAAGCTGAGTGTgGCTGC aAcTCAGcttctGaa	AF190170.1	AGTTGAAGTgATGATTCATTGTGgATGA-AAAAATGGAAgTgAATC-ATTGA-TGGAA
NSP3_YMRotavirus	tCT-ATTATAACCTCTCTTTGAAGCTGAGTGTgGCTGC aAcTCAGcttctGaa	NSP3_YMRotavirus	AGTTGAAGTgATGATTCATTGTGgATGA-AAAAATGGAAgTgAATC-ATTGA-TGGAA
NSP3_OSURotavirus	tCT-ATTATAACCTCTCTTTGAAGCTGAGTGTgGCTGC aAcTCAGcttctGaa	NSP3_OSURotavirus	AGTTGAAGTgATGATTCATTGTGgATGA-AAAAATGGAAgTgAATC-ATTGA-TGGAA
NSP3_69HRotavirus	tATGGG-AtAgAAATAGATTatcAgGatATATATCTAGAGTaaAgaaTAATTTGATT-	NSP3_69HRotavirus	ATCgCG-TATGACa-TTgAGG-AMAG-ITTTGA-YCAtTgAAactAGGt-aaTGAAGAA
NSP3_RRVRotavirus	pATGGGTATCAATATGATCAACAATGAAATTAATTAATTAATTTGATT-	NSP3_RRVRotavirus	ATCgCG-TATGACa-TTgAGG-AMAG-ITTTGA-YCAtTgAAactAGGt-aaTGAAGAA
NSP3_UKRotavirus	AAATGGGTATCAATATGATCAACAATGAAATTAATTAATTAATTTGATT-	NSP3_UKRotavirus	ATCgCG-TATGACa-TTgAGG-AMAG-ITTTGA-YCAtTgAAactAGGt-aaTGAAGAA
NSP3_WaRotavirus	AAATGGGTATCAATATGATCAACAATGAAATTAATTAATTAATTTGATT-	NSP3_WaRotavirus	ATCgCG-TATGACa-TTgAGG-AMAG-ITTTGA-YCAtTgAAactAGGt-aaTGAAGAA
Wt1-5contig_7	AAATGGGTATCAATATGATCAACAATGAAATTAATTAATTAATTTGATT-	Wt1-5contig_7	ATCgCG-TATGACa-TTgAGG-AMAG-ITTTGA-YCAtTgAAactAGGt-aaTGAAGAA
AF190170.1	AAATGGGTATCAATATGATCAACAATGAAATTAATTAATTAATTTGATT-	AF190170.1	ATCgCG-TATGACa-TTgAGG-AMAG-ITTTGA-YCAtTgAAactAGGt-aaTGAAGAA
NSP3_YMRotavirus	pATGGGTATCAATATGATCAACAATGAAATTAATTAATTAATTTGATT-	NSP3_YMRotavirus	ATCgCG-TATGACa-TTgAGG-AMAG-ITTTGA-YCAtTgAAactAGGt-aaTGAAGAA
NSP3_OSURotavirus	pATGGGTATCAATATGATCAACAATGAAATTAATTAATTAATTTGATT-	NSP3_OSURotavirus	ATCgCG-TATGACa-TTgAGG-AMAG-ITTTGA-YCAtTgAAactAGGt-aaTGAAGAA
NSP3_69HRotavirus	TGTGATGGA-GAtCTGGGTAAAAAATCTgattGGTAAGCAATAATTGATCA	NSP3_69HRotavirus	ATATAATAATGGGtattGAAAGCAaa-TgAATGAAAATGc-attCTCTCAAAA
NSP3_RRVRotavirus	aGtATAGGATGAtCTGGGTAAAAAATCTgattGGTAAGCAATAATTGATCA	NSP3_RRVRotavirus	ATATAATAATGGGtattGAAAGCAaa-TgAATGAAAATGc-attCTCTCAAAA
NSP3_UKRotavirus	TGTGATGGA-GAtCTGGGTAAAAAATCTgattGGTAAGCAATAATTGATCA	NSP3_UKRotavirus	ATATAATAATGGGtattGAAAGCAaa-TgAATGAAAATGc-attCTCTCAAAA
NSP3_WaRotavirus	TGTGATGGA-GAtCTGGGTAAAAAATCTgattGGTAAGCAATAATTGATCA	NSP3_WaRotavirus	ATATAATAATGGGtattGAAAGCAaa-TgAATGAAAATGc-attCTCTCAAAA
Wt1-5contig_7	TGTGATGGA-GAtCTGGGTAAAAAATCTgattGGTAAGCAATAATTGATCA	Wt1-5contig_7	ATATAATAATGGGtattGAAAGCAaa-TgAATGAAAATGc-attCTCTCAAAA
AF190170.1	TGTGATGGA-GAtCTGGGTAAAAAATCTgattGGTAAGCAATAATTGATCA	AF190170.1	ATATAATAATGGGtattGAAAGCAaa-TgAATGAAAATGc-attCTCTCAAAA
NSP3_YMRotavirus	TGTGATGGA-GAtCTGGGTAAAAAATCTgattGGTAAGCAATAATTGATCA	NSP3_YMRotavirus	ATATAATAATGGGtattGAAAGCAaa-TgAATGAAAATGc-attCTCTCAAAA
NSP3_OSURotavirus	TGTGATGGA-GAtCTGGGTAAAAAATCTgattGGTAAGCAATAATTGATCA	NSP3_OSURotavirus	ATATAATAATGGGtattGAAAGCAaa-TgAATGAAAATGc-attCTCTCAAAA
NSP3_69HRotavirus	aGctTtAgAAatAAATTTGAGtCTGCTatAGAAATAGAAA-TGG-TgCTGAtatCTC	NSP3_69HRotavirus	TGTGATCTCAACAGCAAGca-AtATAGCTAGGctCTCAAGTgTaa-aATAATA-TAg
NSP3_RRVRotavirus	aGctTtAgAAatAAATTTGAGtCTGCTatAGAAATAGAAA-TGG-TgCTGAtatCTC	NSP3_RRVRotavirus	TGTGATCTCAACAGCAAGca-AtATAGCTAGGctCTCAAGTgTaa-aATAATA-TAg
NSP3_UKRotavirus	EGGca-TBAATGAAATTTGCTCAAgTATpAGAAATaAAATTTGGATGACTG-...TTC	NSP3_UKRotavirus	TGTGATCTCAACAGCAAGca-AtATAGCTAGGctCTCAAGTgTaa-aATAATA-TAg
NSP3_WaRotavirus	EGGCGTAAATGAAA-TTTGCTCAAGCTATTTAGAAATAGAAA-TGGATGACTG-...TTC	NSP3_WaRotavirus	TGTGATCTCAACAGCAAGca-AtATAGCTAGGctCTCAAGTgTaa-aATAATA-TAg
Wt1-5contig_7	EGGCGTAAATGAAA-TTTGCTCAAGCTATTTAGAAATAGAAA-TGGATGACTG-...TTC	Wt1-5contig_7	TGTGATCTCAACAGCAAGca-AtATAGCTAGGctCTCAAGTgTaa-aATAATA-TAg
AF190170.1	EGGCGTAAATGAAA-TTTGCTCAAGCTATTTAGAAATAGAAA-TGGATGACTG-...TTC	AF190170.1	TGTGATCTCAACAGCAAGca-AtATAGCTAGGctCTCAAGTgTaa-aATAATA-TAg
NSP3_YMRotavirus	EGGCGTAAATGAAA-TTTGCTCAAGCTATTTAGAAATAGAAA-TGGATGACTG-...TTC	NSP3_YMRotavirus	TGTGATCTCAACAGCAAGca-AtATAGCTAGGctCTCAAGTgTaa-aATAATA-TAg
NSP3_OSURotavirus	EGGCGTAAATGAAA-TTTGCTCAAGCTATTTAGAAATAGAAA-TGGATGACTG-...TTC	NSP3_OSURotavirus	TGTGATCTCAACAGCAAGca-AtATAGCTAGGctCTCAAGTgTaa-aATAATA-TAg
NSP3_69HRotavirus	TaaGcAcTaaattggatggaggatgaaacaaactaaagaatgatgttatcatcaaaagg	NSP3_69HRotavirus	A-gTGATTTGCAAAATAAATTTGgTcCTactTCtCGaTTGAATGGTAT-TAGATC
NSP3_RRVRotavirus	TaaGcAcTaaattggatggaggatgaaacaaactaaagaatgatgttatcatcaaaagg	NSP3_RRVRotavirus	A-gTGATTTGCAAAATAAATTTGgTcCTactTCtCGaTTGAATGGTAT-TAGATC
NSP3_UKRotavirus	TaaGcAcTaaattggatggaggatgaaacaaactaaagaatgatgttatcatcaaaagg	NSP3_UKRotavirus	A-gTGATTTGCAAAATAAATTTGgTcCTactTCtCGaTTGAATGGTAT-TAGATC
NSP3_WaRotavirus	TaaGcAcTaaattggatggaggatgaaacaaactaaagaatgatgttatcatcaaaagg	NSP3_WaRotavirus	A-gTGATTTGCAAAATAAATTTGgTcCTactTCtCGaTTGAATGGTAT-TAGATC
Wt1-5contig_7	TaaGcAcTaaattggatggaggatgaaacaaactaaagaatgatgttatcatcaaaagg	Wt1-5contig_7	A-gTGATTTGCAAAATAAATTTGgTcCTactTCtCGaTTGAATGGTAT-TAGATC
AF190170.1	TaaGcAcTaaattggatggaggatgaaacaaactaaagaatgatgttatcatcaaaagg	AF190170.1	A-gTGATTTGCAAAATAAATTTGgTcCTactTCtCGaTTGAATGGTAT-TAGATC
NSP3_YMRotavirus	TaaGcAcTaaattggatggaggatgaaacaaactaaagaatgatgttatcatcaaaagg	NSP3_YMRotavirus	A-gTGATTTGCAAAATAAATTTGgTcCTactTCtCGaTTGAATGGTAT-TAGATC
NSP3_OSURotavirus	TaaGcAcTaaattggatggaggatgaaacaaactaaagaatgatgttatcatcaaaagg	NSP3_OSURotavirus	A-gTGATTTGCAAAATAAATTTGgTcCTactTCtCGaTTGAATGGTAT-TAGATC
NSP3_69HRotavirus	aatgatacaaaaatgagagtttaaacgatgctcactagttaaagaatccctggaaa	NSP3_69HRotavirus	aaTGGAAATgacccTGAaaTAAAggc-Ga-ATTGACAGCAa-Ta-AT-TCaATTGATgE
NSP3_RRVRotavirus	aatgatacaaaaatgagagtttaaacgatgctcactagttaaagaatccctggaaa	NSP3_RRVRotavirus	aaTGGAAATgacccTGAaaTAAAggc-Ga-ATTGACAGCAa-Ta-AT-TCaATTGATgE
NSP3_UKRotavirus	aatgatacaaaaatgagagtttaaacgatgctcactagttaaagaatccctggaaa	NSP3_UKRotavirus	aaTGGAAATgacccTGAaaTAAAggc-Ga-ATTGACAGCAa-Ta-AT-TCaATTGATgE
NSP3_WaRotavirus	aatgatacaaaaatgagagtttaaacgatgctcactagttaaagaatccctggaaa	NSP3_WaRotavirus	aaTGGAAATgacccTGAaaTAAAggc-Ga-ATTGACAGCAa-Ta-AT-TCaATTGATgE
Wt1-5contig_7	aatgatacaaaaatgagagtttaaacgatgctcactagttaaagaatccctggaaa	Wt1-5contig_7	aaTGGAAATgacccTGAaaTAAAggc-Ga-ATTGACAGCAa-Ta-AT-TCaATTGATgE
AF190170.1	aatgatacaaaaatgagagtttaaacgatgctcactagttaaagaatccctggaaa	AF190170.1	aaTGGAAATgacccTGAaaTAAAggc-Ga-ATTGACAGCAa-Ta-AT-TCaATTGATgE
NSP3_YMRotavirus	aatgatacaaaaatgagagtttaaacgatgctcactagttaaagaatccctggaaa	NSP3_YMRotavirus	aaTGGAAATgacccTGAaaTAAAggc-Ga-ATTGACAGCAa-Ta-AT-TCaATTGATgE
NSP3_OSURotavirus	aatgatacaaaaatgagagtttaaacgatgctcactagttaaagaatccctggaaa	NSP3_OSURotavirus	aaTGGAAATgacccTGAaaTAAAggc-Ga-ATTGACAGCAa-Ta-AT-TCaATTGATgE
NSP3_69HRotavirus	atcatcatctattataaagtcacaaaattgactgctgataaattggaaactggatgaat	NSP3_69HRotavirus	At-aaTCCaT-Tgc-CCt-TgATGActTgAGATAgTAACTgAAATTTgATtcttG
NSP3_RRVRotavirus	atcatcatctattataaagtcacaaaattgactgctgataaattggaaactggatgaat	NSP3_RRVRotavirus	At-aaTCCaT-Tgc-CCt-TgATGActTgAGATAgTAACTgAAATTTgATtcttG
NSP3_UKRotavirus	atcatcatctattataaagtcacaaaattgactgctgataaattggaaactggatgaat	NSP3_UKRotavirus	At-aaTCCaT-Tgc-CCt-TgATGActTgAGATAgTAACTgAAATTTgATtcttG
NSP3_WaRotavirus	atcatcatctattataaagtcacaaaattgactgctgataaattggaaactggatgaat	NSP3_WaRotavirus	At-aaTCCaT-Tgc-CCt-TgATGActTgAGATAgTAACTgAAATTTgATtcttG
Wt1-5contig_7	atcatcatctattataaagtcacaaaattgactgctgataaattggaaactggatgaat	Wt1-5contig_7	At-aaTCCaT-Tgc-CCt-TgATGActTgAGATAgTAACTgAAATTTgATtcttG
AF190170.1	atcatcatctattataaagtcacaaaattgactgctgataaattggaaactggatgaat	AF190170.1	At-aaTCCaT-Tgc-CCt-TgATGActTgAGATAgTAACTgAAATTTgATtcttG
NSP3_YMRotavirus	atcatcatctattataaagtcacaaaattgactgctgataaattggaaactggatgaat	NSP3_YMRotavirus	At-aaTCCaT-Tgc-CCt-TgATGActTgAGATAgTAACTgAAATTTgATtcttG
NSP3_OSURotavirus	atcatcatctattataaagtcacaaaattgactgctgataaattggaaactggatgaat	NSP3_OSURotavirus	At-aaTCCaT-Tgc-CCt-TgATGActTgAGATAgTAACTgAAATTTgATtcttG
NSP3_69HRotavirus	tgaagtggatgattcattgggataaaaattggaaaggatcattgactggaatc	NSP3_69HRotavirus	TTATGACAatttATtctATGCT-AAAGGAT-aaTcaAGagATGAtTA-CAATATCT
NSP3_RRVRotavirus	tgaagtggatgattcattgggataaaaattggaaaggatcattgactggaatc	NSP3_RRVRotavirus	TTATGACAatttATtctATGCT-AAAGGAT-aaTcaAGagATGAtTA-CAATATCT
NSP3_UKRotavirus	tgaagtggatgattcattgggataaaaattggaaaggatcattgactggaatc	NSP3_UKRotavirus	TTATGACAatttATtctATGCT-AAAGGAT-aaTcaAGagATGAtTA-CAATATCT
NSP3_WaRotavirus	tgaagtggatgattcattgggataaaaattggaaaggatcattgactggaatc	NSP3_WaRotavirus	TTATGACAatttATtctATGCT-AAAGGAT-aaTcaAGagATGAtTA-CAATATCT
Wt1-5contig_7	tgaagtggatgattcattgggataaaaattggaaaggatcattgactggaatc	Wt1-5contig_7	TTATGACAatttATtctATGCT-AAAGGAT-aaTcaAGagATGAtTA-CAATATCT
AF190170.1	tgaagtggatgattcattgggataaaaattggaaaggatcattgactggaatc	AF190170.1	TTATGACAatttATtctATGCT-AAAGGAT-aaTcaAGagATGAtTA-CAATATCT
NSP3_YMRotavirus	tgaagtggatgattcattgggataaaaattggaaaggatcattgactggaatc	NSP3_YMRotavirus	TTATGACAatttATtctATGCT-AAAGGAT-aaTcaAGagATGAtTA-CAATATCT
NSP3_OSURotavirus	tgaagtggatgattcattgggataaaaattggaaaggatcattgactggaatc	NSP3_OSURotavirus	TTATGACAatttATtctATGCT-AAAGGAT-aaTcaAGagATGAtTA-CAATATCT
NSP3_69HRotavirus	ttctagagcaCTAAATgGATGAGGATGAA-AAATAGAAATGATGATC-TC-aa	NSP3_69HRotavirus	AtTctGtTg-T-CAATAA-...ATTGATA-TT-ACCATCACAGTg-ACCCTCTATGAG
NSP3_RRVRotavirus	ttctagagcaCTAAATgGATGAGGATGAA-AAATAGAAATGATGATC-TC-aa	NSP3_RRVRotavirus	AtTctGtTg-T-CAATAA-...ATTGATA-TT-ACCATCACAGTg-ACCCTCTATGAG
NSP3_UKRotavirus	ttctagagcaCTAAATgGATGAGGATGAA-AAATAGAAATGATGATC-TC-aa	NSP3_UKRotavirus	AtTctGtTg-T-CAATAA-...ATTGATA-TT-ACCATCACAGTg-ACCCTCTATGAG
NSP3_WaRotavirus	ttctagagcaCTAAATgGATGAGGATGAA-AAATAGAAATGATGATC-TC-aa	NSP3_WaRotavirus	AtTctGtTg-T-CAATAA-...ATTGATA-TT-ACCATCACAGTg-ACCCTCTATGAG
Wt1-5contig_7	ttctagagcaCTAAATgGATGAGGATGAA-AAATAGAAATGATGATC-TC-aa	Wt1-5contig_7	AtTctGtTg-T-CAATAA-...ATTGATA-TT-ACCATCACAGTg-ACCCTCTATGAG
AF190170.1	ttctagagcaCTAAATgGATGAGGATGAA-AAATAGAAATGATGATC-TC-aa	AF190170.1	AtTctGtTg-T-CAATAA-...ATTGATA-TT-ACCATCACAGTg-ACCCTCTATGAG
NSP3_YMRotavirus	ttctagagcaCTAAATgGATGAGGATGAA-AAATAGAAATGATGATC-TC-aa	NSP3_YMRotavirus	AtTctGtTg-T-CAATAA-...ATTGATA-TT-ACCATCACAGTg-ACCCTCTATGAG
NSP3_OSURotavirus	ttctagagcaCTAAATgGATGAGGATGAA-AAATAGAAATGATGATC-TC-aa	NSP3_OSURotavirus	AtTctGtTg-T-CAATAA-...ATTGATA-TT-ACCATCACAGTg-ACCCTCTATGAG
NSP3_69HRotavirus	AGGAAT-GAtCAAAAATGAGAGTctTaaM-GCaTg-TT-AGTGTAAAAAATACCCTGG	NSP3_69HRotavirus	CACAATAGTAAAAGCTAAAGCTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGGCTTATGTCAG
NSP3_RRVRotavirus	AGGAAT-GAtCAAAAATGAGAGTctTAAATGCTCTTTTAGTGT-aaGGAATACCCTGG	NSP3_RRVRotavirus	CACAATAGTAAAAGCTAAAGCTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGGCTTATGTCAG
NSP3_UKRotavirus	AGGAAT-GAtCAAAAATGAGAGTctTAAATGCTCTTTTAGTGT-aaGGAATACCCTGG	NSP3_UKRotavirus	CACAATAGTAAAAGCTAAAGCTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGGCTTATGTCAG
NSP3_WaRotavirus	AGGAAT-GAtCAAAAATGAGAGTctTAAATGCTCTTTTAGTGT-aaGGAATACCCTGG	NSP3_WaRotavirus	CACAATAGTAAAAGCTAAAGCTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGGCTTATGTCAG
Wt1-5contig_7	AGGAAT-GAtCAAAAATGAGAGTctTAAATGCTCTTTTAGTGT-aaGGAATACCCTGG	Wt1-5contig_7	CACAATAGTAAAAGCTAAAGCTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGGCTTATGTCAG
AF190170.1	AGGAAT-GAtCAAAAATGAGAGTctTAAATGCTCTTTTAGTGT-aaGGAATACCCTGG	AF190170.1	CACAATAGTAAAAGCTAAAGCTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGGCTTATGTCAG
NSP3_YMRotavirus	AGGAAT-GAtCAAAAATGAGAGTctTAAATGCTCTTTTAGTGT-aaGGAATACCCTGG	NSP3_YMRotavirus	CACAATAGTAAAAGCTAAAGCTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGGCTTATGTCAG
NSP3_OSURotavirus	AGGAAT-GAtCAAAAATGAGAGTctTAAATGCTCTTTTAGTGT-aaGGAATACCCTGG	NSP3_OSURotavirus	CACAATAGTAAAAGCTAAAGCTGTCAAAAACCTAAATGGCTATAGGGGGCTTATGTCAG

D. Anexo 4:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Título del proyecto: Caracterización del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral Wt1-5 en cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores B.

Investigador principal: Carlos Arturo Guerrero F. *MD. MSc. PhD.*

Co-investigador: Rafael Antonio Guerrero R. *MD. MSc. (c)PhD.*

Supervisor: Dra. Adiana Linares Ballesteros. *MD. MSc. Esp.*

Organización:

- Laboratorio de Biología Molecular de Virus/ Facultad de Medicina/ Universidad Nacional de Colombia.
- Servicio de Oncohematología Pediátrica/Fundación Hospital de la Misericordia.

Teléfono de contacto: 3165000 Ext: 15052-15053

e-mail de contacto: caguerrero@unal.edu.co

raguerrero@unal.edu.co

INVITACION

El laboratorio de Biología molecular de virus de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia, lo invita a que contribuya con donación de una muestra de sangre de su hijo como donante en este estudio.

INFORMACIÓN

Todos los años, miles de personas desarrollan una enfermedad grave de la médula ósea como lo es la leucemia. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad que afecta a una parte de las células que se encuentran en la médula ósea y que se encargan de formar a los glóbulos blancos llamadas linfoblastos (linfocitos inmaduros). En esta enfermedad los linfocitos inmaduros proliferan y reemplazan las células normales de la sangre, provocando anemia, trombocitopenia (disminución en las plaquetas) y neutropenia (disminución de glóbulos blancos), en grados variables. Los linfoblastos también proliferan anormalmente en órganos diferentes a la médula ósea, particularmente el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos. Esta enfermedad es tratada tradicionalmente con radioterapia y quimioterapia, aunque actualmente se buscan nuevas alternativas que ayuden, sean más efectivas o que generen un menor número de efectos secundarios sobre el paciente; dentro de estos nuevos estudios está el uso de virus que matan específicamente las células leucémicas. A estos virus utilizados como herramientas en la lucha contra la leucemia se llaman virus oncolíticos que son el objeto de nuestro estudio. Estos virus son partículas infecciosas que han sido seleccionadas o rediseñadas genéticamente para crecer exclusivamente en células anormales, atacando específicamente a estas células nocivas y respetando las células normales no enfermas. La terapia con virus oncolíticos ya se encuentra disponible en otros países como Estados Unidos y Canadá, donde se han adelantado muchos estudios de laboratorio y en pacientes para demostrar la seguridad de la terapia; lamentablemente en Colombia aún no se encuentra disponible este tipo de estrategia debido a que no se ha realizado ningún tipo de estudio sobre el tema.

PROPÓSITO

El propósito de este trabajo es evaluar el potencial terapéutico del virus denominado rotavirus Wt1-5 en muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de precursores B. Para llevar a cabo esta tarea se necesita la colaboración de muchas personas, por lo que les

proponemos su participación, aceptando donar desinteresadamente una muestra de 10 ml de sangre, tomada antes del inicio de la quimioterapia, esto con el fin de contribuir a las investigaciones de interés terapéutico acerca de los virus oncolíticos. Es necesario mencionar con antelación que los ensayos con el rotavirus Wt1-5 adaptado se realizarán en el laboratorio de Biología molecular de virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y **NO** se realizará ningún tipo de intervención sobre el paciente, ni sobre el manejo instaurado para el tratamiento de la enfermedad, ni sobre las decisiones tomadas por los médicos tratantes.

Es muy importante que tenga en cuenta que **LA TOMA DE LA MUESTRA DE SANGRE NO REPRESENTA NINGÚN PELIGRO PARA EL NIÑO**. La muestra será manipulada bajo la normatividad ética enunciada en la resolución 008430 capítulos IV de 1993 expedida por el Ministerio de Salud.

SU PAPEL DENTRO DEL PROYECTO

Siendo voluntario para donar una muestra de sangre de su hijo/hija/ o representado, usted estará de acuerdo con lo siguiente:

Usted permitirá que la muestra de sangre sea usada **exclusivamente** dentro del proyecto arriba mencionado para investigar el uso del rotavirus como virus oncolítico en las células de leucemia extraídas en esta muestra.

LOS POSIBLES BENEFICIOS PARA USTED Y SU HIJO

Su participación en este estudio **NO** lo beneficiará a usted ni a su hijo directamente en ningún modo. Sin embargo, uno de los propósitos de este proyecto es contribuir al conocimiento en el área de las ciencias médicas básicas en Colombia y divulgar los resultados en aras de impulsar a otros grupos a trabajar en estas áreas de investigación. Puede ser un beneficio para usted contribuir al conocimiento en esta área, lo cual en un futuro podría ayudar al tratamiento en personas con Leucemia.

ALTERNATIVAS DE PARTICIPACIÓN

Tiene usted la **LIBERTAD DE NO ACEPTAR** esta invitación.

SEGURIDAD

NO hay riesgos físicos para el niño al incorporarse como donante a este proyecto de investigación. Por favor tenga en cuenta que la participación y los resultados que se obtengan en este estudio **NO** modificarán y **NO** realizarán ninguna intervención sobre el manejo brindado a su hijo/hija/ o representado. Se conservará la confidencialidad del donante y sus padres.

REEMBOLSOS A USTED

NO se le pagará a usted por la donación realizada. La donación es totalmente VOLUNTARIA y ALTRUISTA.

GASTOS

Usted **NO** tendrá que cubrir ningún gasto de colección, procesamiento o análisis de la muestra.

CONFIDENCIALIDAD

Su identidad o la del niño **NO** serán reveladas en ninguna forma como resultado de su participación en el proyecto.

PREGUNTAS O DUDAS

Si tiene preguntas o alguna duda sobre esta solicitud o sobre el proyecto en general, por favor remítalas al **LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE VIRUS N° 412 DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA** al **Dr. Carlos Arturo Guerrero Fonseca**, Médico MSc. PhD. director del proyecto o al **Dr. Rafael Guerrero Rojas** Médico MSc. co-investigador del proyecto. Teléfono de contacto 3165000 Ext: 15052-15053.

SU FIRMA ABAJO INDICA QUE USTED HA LEIDO Y ENTENDIDO EL CONSENTIMIENTO INFORMADO, QUE HA TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER PREGUNTAS, QUE SE LE HA DADO LA INFORMACIÓN MAS PRECISA QUE HA SIDO POSIBLE Y QUE ESTA DE ACUERDO EN PARTICIPAR COMO DONANTE DE UNA MUESTRA DE SANGRE DE SU HIJO PARA EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN MENCIONADO.

APROBACIÓN DE DONACIÓN VOLUNTARIA

Declaro que:

1. Entiendo que la donación de sangre periférica para este estudio es libre y voluntaria.
2. Entiendo que el procedimiento para la donación de una muestra de hasta 10 ml de sangre **NO** implicará un riesgo adicional a la salud de mi hijo/hija/ o representado.
3. Entiendo que la muestra de sangre periférica será usada con fines investigativos
4. Entiendo que la participación y los resultados que se obtengan en este estudio no modificaran, ni realizaran ninguna intervención sobre el manejo brindado a mi hijo/hija/ o representado.
5. Entiendo que la información referente a mi hijo/hija/ o representado será manejada de manera confidencial y que será protegida mi identidad.
6. Entiendo que **NO** recibiré ningún estímulo económico por esta donación.
7. He leído y comprendido toda la información entregada, he tenido la oportunidad de formular preguntas y se me han resuelto mis inquietudes.

En consecuencia he decidido libremente realizar la donación de una muestra de sangre periférica.

FECHA: Día: _____ Mes: _____ Año: _____

- Nombre del padre/madre o tutor: _____
CC: _____

Firma: _____

Teléfono de contacto del padre/madre o tutor: _____

- Nombre del testigo: _____
CC: _____

Firma: _____

Teléfono de contacto del testigo: _____

- Persona que suministró la información:
Nombre: _____
CC: _____

Firma: _____

Papel dentro del Proyecto: _____

E. Anexo 5: DOCUMENTO DE ASENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN MENORES DE EDAD

Título del proyecto: Caracterización del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral Wt1-5 en cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores B.

Investigador principal: Carlos Arturo Guerrero F. *MD. MSc. PhD.*

Co-investigador: Rafael Antonio Guerrero R. *MD. MSc. (c) PhD.*

Supervisor: Dra. Adriana Linares Ballesteros. *MD. MSc. Esp.*

Organización:

- Laboratorio de Biología Molecular de Virus/ Facultad de Medicina/ Universidad Nacional de Colombia.
- Servicio de Oncohematología Pediátrica/Fundación Hospital de la Misericordia.

Teléfono de contacto: 3165000 Ext: 15052-15053

e-mail de contacto: caguerrerof@unal.edu.co
raguerreror@unal.edu.co

INFORMACIÓN

Mi nombre es _____ y mi trabajo consiste en investigar acerca del uso de virus para el tratamiento de una enfermedad de la médula ósea llamada leucemia, para ello, nosotros investigamos en el laboratorio qué sucede con las células que están enfermas cuando les agregamos el virus, hacemos esto con el propósito de lograr obtener una nueva forma de tratamiento que en un futuro ayude alternativamente a las personas que tienen esta enfermedad.

A continuación le voy a dar información e invitarle a formar parte de este estudio de investigación. Puede elegir si participa o no. Hemos discutido esta investigación con sus padres/apoderado y ellos saben que le estamos preguntando a usted también para su aceptación. Si va a participar en la investigación, sus padres/apoderado también tienen que aceptarlo. Pero si no desea tomar parte en la investigación no tiene por qué hacerlo, aun cuando sus padres lo hayan aceptado. Puede discutir cualquier aspecto de este documento con sus padres o amigos o cualquier otro con el que se sienta cómodo. Puede decidir participar o no después de haberlo discutido. No tiene que decidirlo inmediatamente. Puede que haya algunas palabras que no entienda o cosas que quiera que se las explique mejor porque está interesado o preocupado por ellas. Por favor, puede pedirme que pare en cualquier momento y me tomaré tiempo para explicarlo. Nadie puede enojarse o enfadarse con usted si decide que no quiere continuar en el estudio.

¿Por qué está haciendo esta investigación?

Queremos saber si en el futuro este virus ayudará a que los niños con leucemia se recuperen de su enfermedad y creemos que esta investigación nos ayudará a poder decir eso.

¿Por qué me pides a mí que participe?

Estamos probando este virus en las células que otros niños de su edad nos han regalado y que tienen leucemia

No tiene por qué participar en esta investigación si no lo desea. Es su decisión si decide participar o no, está bien y no cambiara nada. Incluso si dice que "sí" ahora, puede cambiar de idea más tarde y estará bien.

Si firma este papel quiere decir que lo ha leído, o alguien se lo leyó y que quiere estar en el estudio. Si no quiere estar en el estudio, no lo firme. Recuerde que usted decide estar en el estudio y nadie se puede enojar con usted si no firma el papel o si cambia de idea y después de empezar el estudio se quiere retirar.

He preguntado al niño/a y entiende que su participación es voluntaria SI ____ NO ____

¿Qué me va a suceder?

Vamos a tomar una muestra de sangre en su brazo la cual vamos a utilizar para analizar las células que están enfermas en el laboratorio cuando les agregamos el virus.

He preguntado al niño/a y entiende el procedimiento SI ____ NO ____

¿Es esto malo o peligroso para mí?

El procedimiento es seguro para usted, se hace de forma cotidiana para realizar los exámenes durante la atención que se le brinda en el hospital.

¿Dolerá?

La toma de la muestra puede doler por solo un segundo cuando la aguja ingrese en su brazo. Esto deberá de desaparecer en un día. Si duele por más tiempo o si se endurece o se hincha, comuníquese a sus padres o a mí. Si se siente mal o extraño, díganoslo.

He preguntado al niño/a y entiende los riesgos y molestias SI ____ NO ____

¿Hay algo bueno que vaya a ocurrirme?

El estudio no le va a generar algún beneficio directo. Puede que los resultados que se obtengan en este estudio en un futuro le ayuden a otros niños que tengan una enfermedad similar,

He preguntado al niño/a y entiende los beneficios SI ____ NO ____

¿Obtengo algo por participar en la investigación?

Su participación es muy importante para nosotros pero debemos mencionarle que la donación de la muestra es totalmente voluntaria y no le ofrecemos ningún tipo de incentivo.

He preguntado al niño/a y entiende que no se le dará ningún incentivo SI ____ NO ____

¿Van a saber todos acerca de esto?

No diremos a otras personas que está en ésta investigación y no compartiremos información sobre usted a nadie que no trabaje en el estudio de investigación. Cuando la investigación finalice, nos contactaremos con usted y con sus padres para compartirles los resultados. La información recolectada por la investigación acerca de usted, será retirada y nadie sino exclusivamente los investigadores podrán verla. Cualquier información sobre usted tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se guardará la información con llave. No será compartida ni dada a nadie.

He preguntado al niño/a y entiende la confidencialidad del estudio SI ____ NO ____

¿Me informará de los resultados?

Cuando finalicemos la investigación, Nos contactaremos con usted y sus padre/madre/tutor y les explicaré lo que hemos aprendido. También les daremos un informe con los resultados. Después, informaremos a más gente, a científicos y a otros, sobre la investigación y lo que hemos averiguado. Lo haremos escribiendo y compartiendo informes y yendo a encuentros con personas interesadas en nuestro trabajo.

¿Puedo elegir no participar en la investigación? ¿Puedo cambiar de idea?

No es obligatorio que participe en esta investigación. Nadie se enfadará o molestará con usted si dice que no. Es libre de tomar la decisión. Puede pensar en ello y responder más tarde si quiere. Puede decir “sí” ahora y cambiar de idea más tarde y también estará bien.

¿Con quién puedo hablar para hacer preguntas?

Usted puede hacerme preguntas ahora o más tarde. Puede preguntar al doctor, doctora o a la enfermera. Tengo un número y dirección donde puede localizarme. Si quiere hablar con alguien más que usted conoce como su profesor o médico o un familiar, puede hacerlo también.

Si ha elegido ser parte de esta investigación, también le daré una copia de esta información para usted. Puede pedir a sus padres que lo examinen si usted gusta.

APROBACIÓN DE DONACIÓN VOLUNTARIA

Declaro que:

1. Entiendo que la investigación consiste en probar un virus para el tratamiento de la leucemia usando una muestra de mi sangre para investigación en el laboratorio.
2. Entiendo que daré una muestra de sangre por medio de una punción en el brazo.
3. Entiendo que el estudio se realizará en el laboratorio.
4. Sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo.
5. Sé que puedo retirarme cuando quiera.
6. He leído esta información (ose me ha leído la información) y la entiendo.
7. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo.
8. Entiendo que cualquier cambio se discutirá conmigo.
9. Acepto participar en la investigación.

“Yo no deseo participar en la investigación y no he firmado el asentimiento que sigue”.

_____ (Nombre o iniciales del niño/menor).

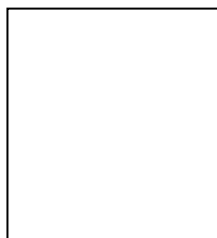
Solo si el niño/a asiente:

Nombre del niño/a _____

Firma del niño/a: _____

Fecha (Día/mes/año): _____

Huella dactilar del niño/menor:



Nota: Si es analfabeto: Una persona que sepa leer y escribir debe firmar (si es posible, esta persona debería ser seleccionada por el participante, no ser uno de los padres, y no debería tener conexión con el equipo de investigación). Los niños analfabetos deben incluir su huella dactilar también.

“He sido testigo de la lectura exacta del documento de asentimiento al participante potencial y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando de que ha dado su asentimiento libremente”.

Nombre del testigo (diferente de los padres): _____

Nº identificación: _____

Firma del testigo _____

Fecha (Día/mes/año): _____

Copia dada al participante SI ___ **NO** ___

El Padre/madre/apoderado ha firmado un consentimiento informado SI ___ **NO** ___

Persona que suministró la información:

Nombre: _____

Nº identificación: _____

Firma: _____

Papel dentro del Proyecto: _____

F. Anexo 6: Certificado participación congreso internacional “2nd World Congress on Cancer Research and Therapy” Octubre 02-04 de 2017. San Diego CA, USA.



**G. Anexo 7: Certificado participación congreso “
III congreso latinoamericano de Virología, VII
Simposio Nacional de Virología” 30 de Noviembre al
02 de Diciembre de 2017. Medellín, Colombia**



LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE VIROLOGÍA – ACV

Certifica que:

RAFAEL ANTONIO GUERRERO ROJAS

Participó en calidad de **PONENTE** en el

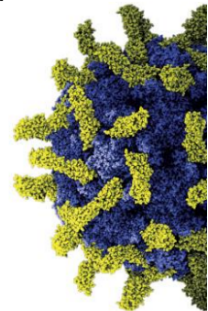
**VII Simposio Nacional de Virología
III Congreso Latinoamericano de Virología**

Realizado del 30 de Noviembre al 02 de Diciembre del 2017 en la ciudad
de Medellín, Colombia

Intensidad horaria: 22 horas

Julian Ruiz-Saenz
Julián Ruiz Sáenz
Presidente
Asociación Colombiana de Virología

Marlen Martínez Gutiérrez
Marlén Martínez Gutiérrez
Coordinadora General del
Evento



H. Anexo 8: Certificado participación Simposio “Primer simposio de investigación de posgrados en Biotecnología” 17 al 19 de Octubre de 2017. Medellín, Colombia



Instituto de Biotecnología (IBUN)
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Certifican que

Rafael Antonio Guerrero Rojas

c.c. 1049605017

Participó en el

**PRIMER SIMPOSIO DE INVESTIGACIÓN DE POSGRADOS EN
BIOTECNOLOGÍA**

Realizado del 17 al 19 de octubre de 2017 en la ciudad de Bogotá con intensidad de
24 horas

Dado en Bogotá D.C., el 19 de octubre de 2017

Carlos Arturo Martínez R.
Director Instituto de Biotecnología
IBUN

Sonia Amparo Ospina S.
Presidenta Comité Científico

Helbert Barbosa B.
Secretario Facultad de Ciencias

I. Anexo 9: Artículo publicado. “Quantifying rotavirus kinetics in the Reh tumor cell line using in vitro data”

Virus Research 244 (2018) 53–63



Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Quantifying rotavirus kinetics in the REH tumor cell line using in vitro data



Gilberto González-Parra^{a,b}, Hana M. Dobrovoly^{b,*}, Diego F. Aranda^c, Benito Chen-Charpentier^d, Rafael Antonio Guerrero Rojas^e

^a Department of Physics and Astronomy, Texas Christian University, Fort Worth, TX, USA

^b Department of Mathematics, New Mexico Tech, Socorro, NM, USA

^c Facultad de Ciencias, Departamento de Matemáticas, Universidad El Bosque, Bogotá D.C., Colombia

^d Department of Mathematics, University of Texas at Arlington, TX, USA

^e Grupo de Biología Molecular del Virus, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:
Rotavirus
Mathematical model
Oncolytic virus
Eclipse
Infectious lifespan

ABSTRACT

Globally, rotavirus is the most common cause of diarrhea in children younger than 5 years of age, however, a quantitative understanding of the infection dynamics is still lacking. In this paper, we present the first study to extract viral kinetic parameters for *in vitro* rotavirus infections in the REH cell tumor line. We use a mathematical model of viral kinetics to extract parameter values by fitting the model to data from rotavirus infection of REH cells. While accurate results for some of the parameters of the mathematical model were not achievable due to its global non-identifiability, we are able to quantify approximately the time course of the infection for the first time. We also find that the basic reproductive number of rotavirus, which gives the number of secondary infections from a single infected cell, is much greater than one. Quantifying the kinetics of rotavirus leads not only to a better understanding of the infection process, but also provides a method for quantitative comparison of kinetics of different strains or for quantifying the effectiveness of antiviral treatment.

1. Introduction

Diarrhea is one of the leading causes of mortality among children under five years old worldwide (Black et al., 2010). Rotaviruses are the single most important agents of diarrhea associated with mortality in this age group (Bruun et al., 2016; Ho et al., 1988). While there is a rotavirus vaccine that has mitigated some of the disease burden in wealthy countries (Gervasi et al., 2016; Prelog et al., 2016; Lamberti et al., 2016), rotavirus still creates a heavy burden in low income countries (Bennett et al., 2016; Mehendale et al., 2016; Lamberti et al., 2016). Issues such as low vaccine coverage and low on-time immunization in developing countries limit the benefits of vaccination (Guerrero et al., 2013; Santosham, 2010). Thus, there is still a need to develop strategies for treating rotavirus-associated diarrhea, especially in the poorest countries (Guerrero et al., 2014). A number of different compounds are currently being developed (Guerrero et al., 2014; Lopez et al., 2015; Galan et al., 2016; Yin et al., 2015; Kang et al., 2015; Lee et al., 2015), but there is still more testing to do.

Recently, researchers have also started investigating rotavirus for its use in oncolytic virotherapy (Guerrero et al., 2016). Some viruses have the ability to selectively infect and kill cancer cells, a property researchers are trying to exploit to treat cancer (Huang et al., 2016;

Delwar et al., 2016; Zhao et al., 2016). Rotavirus could be a good candidate for this application since it has a natural very specific cell selection mechanism (Bass et al., 1992; Fleming et al., 2011), but we need a better understanding of rotavirus infections in cancer cells to continue development of rotavirus for oncolytic virotherapy.

Mathematical models of viral infections are now being used to further our understanding of several different viruses including influenza (Baccam et al., 2006), human immunodeficiency virus (Perelson et al., 1996), hepatitis (Neumann et al., 1998), respiratory syncytial virus (Gonzalez-Parra and Dobrovoly, 2015), and ebola (Nguyen et al., 2015). These models have been used to quantify key parameters of the infection processes (Baccam et al., 2006; Perelson et al., 1996; Neumann et al., 1998; Pinilla et al., 2012), optimize drug treatment regimens (Sheikhan and Ghoreishi, 2013; Zhang et al., 2002; Padhi and Bhardhwaj, 2009; Dobrovoly et al., 2011, 2013), and understand complex host–virus interactions (Atkins et al., 2012; Dobrovoly et al., 2011, 2013; Canini and Carrat, 2011). While mathematical models have been used to study spread of rotavirus at the population level (Omondi et al., 2015; Lopman et al., 2012; Atkins et al., 2012; Pitzer et al., 2011), models of within host dynamics have not yet been applied to rotavirus.

In this paper, we use a mathematical model to extract parameters

* Corresponding author.

E-mail address: h.dobrovoly@tcu.edu (H.M. Dobrovoly).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.023>

Received 21 November 2016; Received in revised form 5 September 2017; Accepted 28 September 2017

Available online 03 November 2017

0168-1702/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

J. Anexo 10: Artículo sometido. “Assessing the oncolytic potential of rotavirus on mouse myeloma cell line Sp2/0-Ag14”

Cancer Investigation



Assessing the oncolytic potential of rotavirus on mouse myeloma cell line Sp2/0-Ag14

Journal:	<i>Cancer Investigation</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Guerrero, Rafael ; Universidad Nacional de Colombia, Physiological Sciences Guerrero, Carlos; Universidad Nacional de Colombia, Physiological Sciences Guzman, Fanny; Pontificia Universidad Catolica de Valparaiso, Núcleo de Biotecnología Curauma Acosta, Orlando; Universidad Nacional de Colombia, Physiological Sciences
Keywords:	Rotaviruses, Oncolytic viruses, Heat shock proteins, Cancer treatment, Apoptosis

SCHOLARONE™
Manuscripts

K. Anexo 11: Artículo sometido. “Oncolytic effect of rotavirus Wt1-5 in the human acute lymphoblastic leukemia cell line Reh”

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



Oncolytic effect of rotavirus Wt1-5 in the human acute lymphoblastic leukemia cell line Reh

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	MIOC-2018-0255
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	21-May-2018
Complete List of Authors:	Guerrero, Rafael; Universidad nacional de Colombia, Ciencias Fisiológicas Guerrero, Carlos; Universidad Nacional de Colombia, Ciencias Fisiológicas Acosta, Orlando; Universidad nacional de Colombia, Ciencias Fisiológicas
Keyword:	Rotaviruses, Oncolytic viruses, Acute lymphoblastic leukemia, heat shock proteins, cancer treatment
Theme:	Therapy, Molecular Biology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Bibliografía

1. Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2017) Cancer Statistics, 2017, *CA Cancer J Clin* 67, 7-30.
2. Jabbour, E., O'Brien, S., Konopleva, M., and Kantarjian, H. (2015) New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia, *Cancer* 121, 2517-2528.
3. Hunger, S. P., and Mullighan, C. G. (2015) Acute Lymphoblastic Leukemia in Children, *N Engl J Med* 373, 1541-1552.
4. Terwilliger, T., and Abdul-Hay, M. (2017) Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update, *Blood Cancer J* 7, e577.
5. Gupta, S., Antillon, F. A., Bonilla, M., Fu, L., Howard, S. C., Ribeiro, R. C., and Sung, L. (2011) Treatment-related mortality in children with acute lymphoblastic leukemia in Central America, *Cancer* 117, 4788-4795.
6. Kato, M., and Manabe, A. (2017) Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia, *Pediatr Int* 60, 4-12.
7. Ness, K. K., Armenian, S. H., Kadan-Lottick, N., and Gurney, J. G. (2011) Adverse effects of treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia: general overview and implications for long-term cardiac health, *Expert Rev Hematol* 4, 185-197.
8. Shah, N., Al-Ahmari, A., Al-Yamani, A., Dupuis, L., Stephens, D., and Hitzler, J. (2009) Outcome and toxicity of chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome, *Pediatr Blood Cancer* 52, 14-19.
9. Garzon, R., Calin, G. A., and Croce, C. M. (2009) MicroRNAs in Cancer, *Annu Rev Med* 60, 167-179.
10. Garzon, R., Marcucci, G., and Croce, C. M. (2010) Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges, *Nat Rev Drug Discov* 9, 775-789.
11. Guo, W., Chen, W., Yu, W., Huang, W., and Deng, W. (2013) Small interfering RNA-based molecular therapy of cancers, *Chin J Cancer* 32, 488-493.
12. de Fougerolles, A., Vornlocher, H. P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007) Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics, *Nat Rev Drug Discov* 6, 443-453.
13. Nakamura, K., and Smyth, M. J. (2017) Targeting cancer-related inflammation in the era of immunotherapy, *Immunol Cell Biol* 95, 325-332.
14. Bagnyukova, T. V., Serebriiskii, I. G., Zhou, Y., Hopper-Borge, E. A., Golemis, E. A., and Astsaturov, I. (2010) Chemotherapy and signaling: How can targeted therapies supercharge cytotoxic agents?, *Cancer Biol Ther* 10, 839-853.
15. Atherton, M. J., and Lichty, B. D. (2013) Evolution of oncolytic viruses: novel strategies for cancer treatment, *Immunotherapy* 5, 1191-1206.
16. Patel, M. R., and Kratzke, R. A. (2013) Oncolytic virus therapy for cancer: the first wave of translational clinical trials, *Transl Res* 161, 355-364.

17. Liu, T. C., and Kirn, D. (2007) Systemic efficacy with oncolytic virus therapeutics: clinical proof-of-concept and future directions, *Cancer Res* 67, 429-432.
18. Roberts, M. S., Lorence, R. M., Groene, W. S., and Bamat, M. K. (2006) Naturally oncolytic viruses, *Curr Opin Mol Ther* 8, 314-321.
19. Garant, K. A., Shmulevitz, M., Pan, L., Daigle, R. M., Ahn, D. G., Gujar, S. A., and Lee, P. W. (2016) Oncolytic reovirus induces intracellular redistribution of Ras to promote apoptosis and progeny virus release, *Oncogene* 35, 771-782.
20. Guo, Z. S., Thorne, S. H., and Bartlett, D. L. (2008) Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses, *Biochim Biophys Acta* 1785, 217-231.
21. Vaha-Koskela, M., and Hinkkanen, A. (2014) Tumor Restrictions to Oncolytic Virus, *Biomedicines* 2, 163-194.
22. Guerrero, C. A., Mendez, E., Zarate, S., Isa, P., Lopez, S., and Arias, C. F. (2000) Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14644-14649.
23. Zarate, S., Romero, P., Espinosa, R., Arias, C. F., and Lopez, S. (2004) VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin alphavbeta3 through a novel integrin-binding site, *J Virol* 78, 10839-10847.
24. Zarate, S., Espinosa, R., Romero, P., Guerrero, C. A., Arias, C. F., and Lopez, S. (2000) Integrin alpha2beta1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3, *Virology* 278, 50-54.
25. Ciarlet, M., Crawford, S. E., Cheng, E., Blutt, S. E., Rice, D. A., Bergelson, J. M., and Estes, M. K. (2002) VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment, *J Virol* 76, 1109-1123.
26. Hewish, M. J., Takada, Y., and Coulson, B. S. (2000) Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells, *J Virol* 74, 228-236.
27. Londrigan, S. L., Hewish, M. J., Thomson, M. J., Sanders, G. M., Mustafa, H., and Coulson, B. S. (2000) Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins, *J Gen Virol* 81, 2203-2213.
28. Gualtero, D. F., Guzman, F., Acosta, O., and Guerrero, C. A. (2007) Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection, *Arch Virol* 152, 2183-2196.
29. Guerrero, C. A., Bouyssounade, D., Zarate, S., Isa, P., Lopez, T., Espinosa, R., Romero, P., Mendez, E., Lopez, S., and Arias, C. F. (2002) Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry, *J Virol* 76, 4096-4102.
30. Zarate, S., Cuadras, M. A., Espinosa, R., Romero, P., Juarez, K. O., Camacho-Nuez, M., Arias, C. F., and Lopez, S. (2003) Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5, *J Virol* 77, 7254-7260.

31. Calderon, M. N., Guerrero, C. A., Acosta, O., Lopez, S., and Arias, C. F. (2012) Inhibiting rotavirus infection by membrane-impermeant thiol/disulfide exchange blockers and antibodies against protein disulfide isomerase, *Intervirology* 55, 451-464.
32. Calderon, M. N., Guerrero, C. A., Dominguez, Y., Garzon, E., Barreto, S. M., and Acosta, O. (2011) [Interaction of rotavirus with protein disulfide isomerase in vitro and cell system], *Biomedica* 31, 70-81.
33. Calderón, M. G., F. Acosta, O. Guerrero, C. (2012) 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*. 18., 373–382.
34. Desgrosellier, J. S., and Cheresh, D. A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nat Rev Cancer* 10, 9-22.
35. Wu, J., Liu, T., Rios, Z., Mei, Q., Lin, X., and Cao, S. (2017) Heat Shock Proteins and Cancer, *Trends Pharmacol Sci* 38, 226-256.
36. Lee, E., and Lee, D. H. (2017) Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer, *BMB Rep* 50, 401-410.
37. Guerrero, C. A., Guerrero, R. A., Silva, E., Acosta, O., and Barreto, E. (2016) Experimental Adaptation of Rotaviruses to Tumor Cell Lines, *PLoS One* 11, e0147666.
38. Koonin, E. V., Senkevich, T. G., and Dolja, V. V. (2006) The ancient Virus World and evolution of cells, *Biol Direct* 1, 29.
39. Chiocca, E. A. (2002) Oncolytic viruses, *Nat Rev Cancer* 2, 938-950.
40. Martuza, R. L., Malick, A., Markert, J. M., Ruffner, K. L., and Coen, D. M. (1991) Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant, *Science* 252, 854-856.
41. Markert, J. M., Malick, A., Coen, D. M., and Martuza, R. L. (1993) Reduction and elimination of encephalitis in an experimental glioma therapy model with attenuated herpes simplex mutants that retain susceptibility to acyclovir, *Neurosurgery* 32, 597-603.
42. Fountzilias, C., Patel, S., & Mahalingam, D. (2017). Oncolytic virotherapy, updates and future directions. *Oncotarget*, 8(60).
43. Asada, T. (1974) Treatment of human cancer with mumps virus, *Cancer* 34, 1907-1928.
44. Wheelock, E. F., and Dingle, J. H. (1964) Observations on the Repeated Administration of Viruses to a Patient with Acute Leukemia. A Preliminary Report, *N Engl J Med* 271, 645-651.
45. Bluming, A. Z., and Ziegler, J. L. (1971) Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection, *Lancet* 2, 105-106.
46. Taqi, A. M., Abdurrahman, M. B., Yakubu, A. M., and Fleming, A. F. (1981) Regression of Hodgkin's disease after measles, *Lancet* 1, 1112.
47. Moore, A. E. (1952) Viruses with oncolytic properties and their adaptation to tumors, *Ann N Y Acad Sci* 54, 945-952.
48. Moore, A. E. (1954) Effects of viruses on tumors, *Annu Rev Microbiol* 8, 393-410.

49. Newman, W., and Southam, C. M. (1954) Virus treatment in advanced cancer; a pathological study of fifty-seven cases, *Cancer* 7, 106-118.
50. Cassel, W. A., and Garrett, R. E. (1965) Newcastle Disease Virus as an Antineoplastic Agent, *Cancer* 18, 863-868.
51. Vaha-Koskela, M. J., Heikkila, J. E., and Hinkkanen, A. E. (2007) Oncolytic viruses in cancer therapy, *Cancer Lett* 254, 178-216.
52. Southam, C. M. (1960) Present status of oncolytic virus studies, *Trans N Y Acad Sci* 22, 657-673.
53. Ganly, I., Kirn, D., Eckhardt, G., Rodriguez, G. I., Soutar, D. S., Otto, R., Robertson, A. G., Park, O., Gulley, M. L., Heise, C., Von Hoff, D. D., and Kaye, S. B. (2000) A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer, *Clin Cancer Res* 6, 798-806.
54. Ganly, I., Mautner, V., and Balmain, A. (2000) Productive replication of human adenoviruses in mouse epidermal cells, *J Virol* 74, 2895-2899.
55. Aghi, M., and Martuza, R. L. (2005) Oncolytic viral therapies - the clinical experience, *Oncogene* 24, 7802-7816.
56. Tyler, K. L., Squier, M. K., Brown, A. L., Pike, B., Willis, D., Oberhaus, S. M., Dermody, T. S., and Cohen, J. J. (1996) Linkage between reovirus-induced apoptosis and inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 and M2 genes, *J Virol* 70, 7984-7991.
57. Sabin, A. B. (1959) Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described, *Science* 130, 1387-1389.
58. Hashiro, G., Loh, P. C., and Yau, J. T. (1977) The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines, *Arch Virol* 54, 307-315.
59. Duncan, M. R., Stanish, S. M., and Cox, D. C. (1978) Differential sensitivity of normal and transformed human cells to reovirus infection, *J Virol* 28, 444-449.
60. Stoeckel, J., and Hay, J. G. (2006) Drug evaluation: Reolysin--wild-type reovirus as a cancer therapeutic, *Curr Opin Mol Ther* 8, 249-260.
61. Morris, D. G., Forsyth, PA, Paterson, AH, Fonseca, K, Difrancesco, L.M, Thompson, BG et al. . (2002) A phase I clinical trial evaluating intralesional Reolysin (reovirus) in histologically confirmed malignancies., *ASCO Annual Meeting* 54. 244-256.
62. Forsyth, P., Roldan, G., George, D., Wallace, C., Palmer, C. A., Morris, D., Cairncross, G., Matthews, M. V., Markert, J., Gillespie, Y., Coffey, M., Thompson, B., and Hamilton, M. (2008) A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas, *Mol Ther* 16, 627-632.
63. Strong, J. E., Coffey, M. C., Tang, D., Sabinin, P., and Lee, P. W. (1998) The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus, *EMBO J* 17, 3351-3362.
64. Coffey, M. C., Strong, J. E., Forsyth, P. A., and Lee, P. W. (1998) Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway, *Science* 282, 1332-1334.

65. Norman, K. L., Hirasawa, K., Yang, A. D., Shields, M. A., and Lee, P. W. (2004) Reovirus oncolysis: the Ras/RalGEF/p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11099-11104.
66. Thirukkumaran, C. M., Luider, J. M., Stewart, D. A., Cheng, T., Lupichuk, S. M., Nodwell, M. J., Russell, J. A., Auer, I. A., and Morris, D. G. (2003) Reovirus oncolysis as a novel purging strategy for autologous stem cell transplantation, *Blood* 102, 377-387.
67. Smakman, N., van den Wollenberg, D. J., Borel Rinkes, I. H., Hoeben, R. C., and Kranenburg, O. (2005) Sensitization to apoptosis underlies KrasD12-dependent oncolysis of murine C26 colorectal carcinoma cells by reovirus T3D, *J Virol* 79, 14981-14985.
68. Kim, M., Egan, C., Alain, T., Urbanski, S. J., Lee, P. W., Forsyth, P. A., and Johnston, R. N. (2007) Acquired resistance to reoviral oncolysis in Ras-transformed fibrosarcoma cells, *Oncogene* 26, 4124-4134.
69. Comins, C., Heinemann, L., Harrington, K., Melcher, A., De Bono, J., and Pandha, H. (2008) Reovirus: viral therapy for cancer 'as nature intended', *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 20, 548-554.
70. European, M. A. (2008) The international conference on harmonisation (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH considerations to oncolytic viruses, *EMA EMEA/CHMP/ICH/607698/2008*, 1-6.
71. Estes, M. K., and Cohen, J. (1989) Rotavirus gene structure and function, *Microbiol Rev* 53, 410-449.
72. Estes, M. K., and Graham, D. Y. (1985) Rotavirus antigens, *Adv Exp Med Biol* 185, 201-214.
73. Kalica A. R., F. J., Greenberg B. H (1983) Identification of the Rotaviral Gene that Codes for Hemagglutination and Protease-enhanced Plaque Formation, *Virology* 125, 194 – 205
74. Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Roberts, E., Estes, M. K., and Prasad, B. V. (2005) pH-induced conformational change of the rotavirus VP4 spike: implications for cell entry and antibody neutralization, *J Virol* 79, 8572-8580.
75. Arias, C. F., Dector, M. A., Segovia, L., Lopez, T., Camacho, M., Isa, P., Espinosa, R., and Lopez, S. (2004) RNA silencing of rotavirus gene expression, *Virus Res* 102, 43-51.
76. Bagchi, P., Dutta, D., Chattopadhyay, S., Mukherjee, A., Halder, U. C., Sarkar, S., Kobayashi, N., Komoto, S., Taniguchi, K., and Chawla-Sarkar, M. (2010) Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection, *J Virol* 84, 6834-6845.
77. Lopez, S., and Arias, C. F. (2006) Early steps in rotavirus cell entry, *Curr Top Microbiol Immunol* 309, 39-66.

78. Blutt, S. E., and Conner, M. E. (2007) Rotavirus: to the gut and beyond!, *Curr Opin Gastroenterol* 23, 39-43.
79. Berkova, Z., Crawford, S. E., Blutt, S. E., Morris, A. P., and Estes, M. K. (2007) Expression of rotavirus NSP4 alters the actin network organization through the actin remodeling protein cofilin, *J Virol* 81, 3545-3553.
80. Banyai, K., Mijatovic-Rustempasic, S., Hull, J. J., Esona, M. D., Freeman, M. M., Frace, A. M., Bowen, M. D., and Gentsch, J. R. (2011) Sequencing and phylogenetic analysis of the coding region of six common rotavirus strains: evidence for intragenogroup reassortment among co-circulating G1P[8] and G2P[4] strains from the United States, *J Med Virol* 83, 532-539.
81. Organization, P. A. H. (2007) Epidemiologic surveillance of diarrheal diseases due to rotavirus: Field guide, *Organización Panamericana de la Salud Publicación Científica y Técnica No. 623*, 12-43.
82. Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A., and Glass, R. I. (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children, *Emerg Infect Dis* 9, 565-572.
83. Bern, C., Martines, J., de Zoysa, I., and Glass, R. I. (1992) The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update, *Bull World Health Organ* 70, 705-714.
84. Leung, A. K., Kellner, J. D., and Davies, H. D. (2005) Rotavirus gastroenteritis, *Adv Ther* 22, 476-487.
85. López, P., Cáceres, D., López, E. (2005) Enfermedad por rotavirus, características epidemiológicas, características epidemiológicas, clínicas, prevención y manejo, *CCAP* 6, 2.45, 45-55.
86. Arias, C. F., Isa, P., Guerrero, C. A., Mendez, E., Zarate, S., Lopez, T., Espinosa, R., Romero, P., and Lopez, S. (2002) Molecular biology of rotavirus cell entry, *Arch Med Res* 33, 356-361.
87. Ramig, R. F. (2004) Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection, *J Virol* 78, 10213-10220.
88. Blutt, S. E., Matson, D. O., Crawford, S. E., Staat, M. A., Azimi, P., Bennett, B. L., Piedra, P. A., and Conner, M. E. (2007) Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia, *PLoS Med* 4, e121.
89. Feng, N., Kim, B., Fenaux, M., Nguyen, H., Vo, P., Omary, M. B., and Greenberg, H. B. (2008) Role of interferon in homologous and heterologous rotavirus infection in the intestines and extraintestinal organs of suckling mice, *J Virol* 82, 7578-7590.
90. Ciarlet, M., Ludert, J. E., Iturriza-Gomara, M., Liprandi, F., Gray, J. J., Desselberger, U., and Estes, M. K. (2002) Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin, *J Virol* 76, 4087-4095.
91. Ciarlet, M., Hyser, J. M., and Estes, M. K. (2002) Sequence analysis of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 gene products of the bovine rotavirus WC3, *Virus Genes* 24, 107-118.
92. Santana, A. Y., Guerrero, C. A., and Acosta, O. (2013) Implication of Hsc70, PDI and integrin alphavbeta3 involvement during entry of the murine

- rotavirus ECwt into small-intestinal villi of suckling mice, *Arch Virol* 158, 1323-1336.
93. Isa, P., Arias, C. F., and Lopez, S. (2006) Role of sialic acids in rotavirus infection, *Glycoconj J* 23, 27-37.
 94. Ciarlet, M., Crawford, S. E., and Estes, M. K. (2001) Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains, *J Virol* 75, 11834-11850.
 95. Fleming, F. E., Graham, K. L., Taniguchi, K., Takada, Y., and Coulson, B. S. (2007) Rotavirus-neutralizing antibodies inhibit virus binding to integrins alpha 2 beta 1 and alpha 4 beta 1, *Arch Virol* 152, 1087-1101.
 96. Graham, K. L., Fleming, F. E., Halasz, P., Hewish, M. J., Nagesha, H. S., Holmes, I. H., Takada, Y., and Coulson, B. S. (2005) Rotaviruses interact with alpha4beta7 and alpha4beta1 integrins by binding the same integrin domains as natural ligands, *J Gen Virol* 86, 3397-3408.
 97. Graham, K. L., Zeng, W., Takada, Y., Jackson, D. C., and Coulson, B. S. (2004) Effects on rotavirus cell binding and infection of monomeric and polymeric peptides containing alpha2beta1 and alphaxbeta2 integrin ligand sequences, *J Virol* 78, 11786-11797.
 98. Graham, K. L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M. J., Takada, Y., Mackow, E. R., Robinson, M. K., and Coulson, B. S. (2003) 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* 77, 9969-9978.
 99. Guerrero, C. A., and Moreno, L. P. (2012) Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin alphavbeta3 are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells, *Acta Virol* 56, 63-70.
 100. Calderón, M., Guzmán, Fanny., Acosta, Orlando., Guerrero, Carlos. (2012) 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*.
 101. Guerrero, C. A., Murillo, A., and Acosta, O. (2012) Inhibition of rotavirus infection in cultured cells by N-acetyl-cysteine, PPARgamma agonists and NSAIDs, *Antiviral Res* 96, 1-12.
 102. Springthorpe, V. S., Grenier, J. L., Lloyd-Evans, N., and Sattar, S. A. (1986) Chemical disinfection of human rotaviruses: efficacy of commercially-available products in suspension tests, *J Hyg (Lond)* 97, 139-161.
 103. Lloyd-Evans, N., Springthorpe, V. S., and Sattar, S. A. (1986) Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces, *J Hyg (Lond)* 97, 163-173.
 104. Ward, R. L., Bernstein, D. I., Knowlton, D. R., Sherwood, J. R., Young, E. C., Cusack, T. M., Rubino, J. R., and Schiff, G. M. (1991) Prevention of surface-to-human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray, *J Clin Microbiol* 29, 1991-1996.

105. Weiss, C., and Clark, H. F. (1985) Rapid inactivation of rotaviruses by exposure to acid buffer or acidic gastric juice, *J Gen Virol* 66 (Pt 12), 2725-2730.
106. Estes, M. K., Graham, D. Y., Smith, E. M., and Gerba, C. P. (1979) Rotavirus stability and inactivation, *J Gen Virol* 43, 403-409.
107. Fischer, T. K., Valentiner-Branth, P., Steinsland, H., Perch, M., Santos, G., Aaby, P., Molbak, K., and Sommerfelt, H. (2002) Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa, *J Infect Dis* 186, 593-597.
108. Rodrigues, A., de Carvalho, M., Monteiro, S., Mikkelsen, C. S., Aaby, P., Molbak, K., and Fischer, T. K. (2007) Hospital surveillance of rotavirus infection and nosocomial transmission of rotavirus disease among children in Guinea-Bissau, *Pediatr Infect Dis J* 26, 233-237.
109. Martella, V., Banyai, K., Matthijssens, J., Buonavoglia, C., and Ciarlet, M. (2010) Zoonotic aspects of rotaviruses, *Vet Microbiol* 140, 246-255.
110. CDC, C. f. d. c. a. p. (2009) Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 5 th edition., *U.S. Department of health an human services* 21-1112.
111. WHO, W. H. O. (2005) Laboratory biosafety manual., *World Health Organization 3th Edition*.
112. Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*, *Experientia* 18, 571-573.
113. Morimoto, R. I. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators, *Genes Dev* 12, 3788-3796.
114. Whitley, D., Goldberg, S. P., and Jordan, W. D. (1999) Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones, *J Vasc Surg* 29, 748-751.
115. Coronato, S., Di Girolamo, W., Salas, Margatira., Spinelli, O., Languens, G. (1999) Biología de las proteínas del shock térmico, *Journal de Medicina Buenos Aires* 59, 477-486.
116. Poulain, P., Gelly, J. C., and Flatters, D. (2010) Detection and architecture of small heat shock protein monomers, *PLoS One* 5, e9990.
117. Hu Z, C. L., Zhang J, Li T, Tang J, Xu N, Wang X. (2007) Structure, function, property, and role in neurologic diseases and other diseases of the sHsp22, *J Neurosci Res* 85, 2071-2079.
118. Irobi, J., Van Impe, K., Seeman, P., Jordanova, A., Dierick, I., Verpoorten, N., Michalik, A., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Vennekens, K., Mazanec, R., Tournev, I., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Kremensky, I., Van Den Bosch, V., Robberecht, W., Vandekerckhove, J., Van Broeckhoven, C., Gettemans, J., De Jonghe, P., Timmerman, Joy Irobi, Katrien Van Impe, Pavel Seeman, Albena Jordanova, Ines Dierick, Nathalie Verpoorten, Andrej Michalik, Els De Vriendt, An Jacobs, Veerle Van Gerwen, Krist'i Vennekens, Radim Mazanec, Ivailo Tournev, David Hilton-Jones, Kevin Talbot, Ivo Kremensky, Ludo Van Den Bosch, Wim Robberecht, Joël Vandekerckhove, Christine Van Broeckhoven, Jan Gettemans, Peter De Jonghe, Timmerman,

- V. (2004) Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy, *Nature* 36, 597-601.
119. Ackerley, S., James, P., Kalli, A., French, S., Davies, K., Talbot, K. (2006) A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuronopathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes, *Hum Mol Genet* 15, 347-354.
 120. Van de Klundert, F., Gijsen, M., Van del Ijssel, P., Snoeckx, L. (1998) Alpha B-crystallin and hsp25 in neonatal cardiac cells differences in cellular localization under stress conditions. *Eur J Cell Biol Eur J Cell Biol* 75, 38-45.
 121. Klemenz, R., Andres, A., Fröhli, E., Schäfer, R., Aoyama, A. (1993) Expression of the murine small heat shock proteins hsp25 and α B crystallin in the absence of stress, *J Cell Biol* 120, 639-645.
 122. Houlden, H., De Vrièze, W., Blake, J., Wood, N., Reilly, M. (2008) Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2, *Neurology* 71, 1660-1668.
 123. Ciocca, D., Stati, A., Fanelli, M., Gaestel, M. (1996) Expression of heat shock protein 25000 in rat uterus during pregnancy and pseudopregnancy *Biol Reprod* 54, 1326-1335
 124. Li, D., Gordon, C., Stagg, C., Udelsman, R. . (1996) Heat shock protein expression in human placenta and umbilical cord, *Shock* 5, 320-323.
 125. Xu, Q., and Wick, G. (1996) The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall, *Mol Med Today* 2, 372-379.
 126. Hassan, S., Biswas, M. H., Zhang, C., Du, C., and Balaji, K. C. (2009) Heat shock protein 27 mediates repression of androgen receptor function by protein kinase D1 in prostate cancer cells, *Oncogene* 28, 4386-4396.
 127. Ciocca, D. R., and Luque, E. H. (1991) Immunological evidence for the identity between the hsp27 estrogen-regulated heat shock protein and the p29 estrogen receptor-associated protein in breast and endometrial cancer, *Breast Cancer Res Treat* 20, 33-42.
 128. Davey, K., Parboosingh, J., McLeod, D., Chan. A., Casey, R., Ferreira, P., Snyder, F., Bridge, P., Bernier, F. (2006) Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition, *J Med Genet* 43, 385-393.
 129. Hata, M., Okumura, K., Seto, M., and Ohtsuka, K. (1996) Genomic cloning of a human heat shock protein 40 (Hsp40) gene (HSPF1) and its chromosomal localization to 19p13.2, *Genomics* 38, 446-449.
 130. Borges, J. C., Fischer, H., Craievich, A. F., and Ramos, C. H. (2005) Low resolution structural study of two human HSP40 chaperones in solution. DJA1 from subfamily A and DJB4 from subfamily B have different quaternary structures, *The Journal of biological chemistry* 280, 13671-13681.
 131. Hansen, J. J., Bross, P., Westergaard, M., Nielsen, M. N., Eiberg, H., Borglum, A. D., Mogensen, J., Kristiansen, K., Bolund, L., and Gregersen, N. (2003) Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes:

- HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter, *Hum Genet* 112, 71-77.
132. Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines, *Cell* 92, 351-366.
 133. Hendershot, L. M., Valentine, V. A., Lee, A. S., Morris, S. W., and Shapiro, D. N. (1994) Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34, *Genomics* 20, 281-284.
 134. Brocchieri, L., Conway de Macario, E., Macario, A. . (2008) hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions, *BMC Evol Biol* 23, 8-19.
 135. Osipiuk, J., Walsh, M. A., Freeman, B. C., Morimoto, R. I., and Joachimiak, A. (1999) Structure of a new crystal form of human Hsp70 ATPase domain, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1105-1107.
 136. Chen, B., Piel, W. H., Gui, L., Bruford, E., and Monteiro, A. (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution, *Genomics* 86, 627-637.
 137. Sidera, K., Samiotaki, M., Yfanti, E., Panayotou, G., and Patsavoudi, E. (2004) Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system, *The Journal of biological chemistry* 279, 45379-45388.
 138. Becker, B., Multhoff, G., Farkas, B., Wild, P. J., Landthaler, M., Stolz, W., and Vogt, T. (2004) Induction of Hsp90 protein expression in malignant melanomas and melanoma metastases, *Exp Dermatol* 13, 27-32.
 139. Tsutsumi, S., and Neckers, L. (2007) Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis, *Cancer Sci* 98, 1536-1539.
 140. Helmbrecht, K., Zeise, E., and Rensing, L. (2000) Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review, *Cell Prolif* 33, 341-365.
 141. Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., and Garrido, C. (2006) Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death, *Handb Exp Pharmacol*, 171-198.
 142. Li, Z. (2001) The roles of heat shock proteins in tumor immunity, *Cancer Chemother Biol Response Modif* 19, 371-383.
 143. Multhoff, G. (2006) Heat shock proteins in immunity, *Handb Exp Pharmacol*, 279-304.
 144. Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B., and Ciocca, D. R. (2006) Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis, *Trends Biochem Sci* 31, 164-172.
 145. Shin, B. K., Wang, H., Yim, A. M., Le Naour, F., Brichory, F., Jang, J. H., Zhao, R., Puravs, E., Tra, J., Michael, C. W., Misek, D. E., and Hanash, S. M. (2003) Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function, *J Biol Chem* 278, 7607-7616.

146. Arrigo, A. P. (2005) [Heat shock proteins as molecular chaperones], *Med Sci (Paris)* 21, 619-625.
147. Spiess, C., Meyer, A. S., Reissmann, S., and Frydman, J. (2004) Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets, *Trends Cell Biol* 14, 598-604.
148. Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., and Hartl, F. U. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 781-791.
149. Mayer, M. P., and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism, *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.
150. Wegele, H., Muller, L., and Buchner, J. (2004) Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151, 1-44.
151. Pratt, W. B., and Toft, D. O. (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery, *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 111-133.
152. Easton, D. P., Kaneko, Y., and Subject, J. R. (2000) The hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s, *Cell stress & chaperones* 5, 276-290.
153. Ciocca, D. R., and Calderwood, S. K. (2005) Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications, *Cell Stress Chaperones* 10, 86-103.
154. Xu, A., Tian, Tian., Hao, Jia., Liu, Jifu., Zhang, Zhao. (2007) Elevation of Serum HSP90 α Correlated with the Clinical stage of Non-Small Cell Lung Cancer, *Journal of Cancer Molecules* 3 (4), 107-112.
155. Szymanska, Z., Urbanski, J., and Marciniak-Czochra, A. (2009) Mathematical modelling of the influence of heat shock proteins on cancer invasion of tissue, *J Math Biol* 58, 819-844.
156. Glaessgen, A., Jonmarker, S., Lindberg, A., Nilsson, B., Lewensohn, R., Ekman, P., Valdman, A., and Egevad, L. (2008) Heat shock proteins 27, 60 and 70 as prognostic markers of prostate cancer, *APMIS* 116, 888-895.
157. Garg, M., Kanojia, D., Seth, A., Kumar, R., Gupta, A., Surolia, A., and Suri, A. (2010) Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion, *Eur J Cancer* 46, 207-215.
158. Reyes-Del Valle, J., Chavez-Salinas, S., Medina, F., and Del Angel, R. M. (2005) Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells, *J Virol* 79, 4557-4567.
159. Li, G., Zhang, J., Tong, X., Liu, W., and Ye, X. (2011) Heat shock protein 70 inhibits the activity of Influenza A virus ribonucleoprotein and blocks the replication of virus in vitro and in vivo, *PLoS One* 6, e16546.
160. Gonzalez, O., Fontanes, V., Raychaudhuri, S., Loo, R., Loo, J., Arumugaswami, V., Sun, R., Dasgupta, A., and French, S. W. (2009) The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production, *Hepatology* 50, 1756-1764.

161. Hu, J., Flores, D., Toft, D., Wang, X., and Nguyen, D. (2004) Requirement of heat shock protein 90 for human hepatitis B virus reverse transcriptase function, *J Virol* 78, 13122-13131.
162. Kumar, M., and Mitra, D. (2005) Heat shock protein 40 is necessary for human immunodeficiency virus-1 Nef-mediated enhancement of viral gene expression and replication, *J Biol Chem* 280, 40041-40050.
163. LaFlamme, S. E., and Auer, K. L. (1996) Integrin signaling, *Semin Cancer Biol* 7, 111-118.
164. Filippo, G., Ruoslaht, Erkki. (1999) Integrin Signaling, *Science* 285 (5430), 1028-1033
165. Jiménez, Á., Garrido J., Barbancho, Manuel. (2003) Caracterización molecular de las integrinas beta-1 (CD29) y beta-3 (CD61) porcinas. Obtención de anticuerpos contra dominios específicos de ambas moléculas, *Universidad de Córdoba, Servicio de Publicaciones*.
166. Clezardin, P. (1998) Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis, *Cell Mol Life Sci* 54, 541-548.
167. Parry, C., Bell, S., Minson, T., and Browne, H. (2005) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein H binds to alphavbeta3 integrins, *J Gen Virol* 86, 7-10.
168. Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A., and Nemerow, G. R. (1993) Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment, *Cell* 73, 309-319.
169. Triantafilou, K., Triantafilou, M., Takada, Y., and Fernandez, N. (2000) Human parechovirus 1 utilizes integrins alphavbeta3 and alphavbeta1 as receptors, *J Virol* 74, 5856-5862.
170. Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand, *Science* 296, 151-155.
171. Stromblad, S., and Cheresh, D. A. (1996) Integrins, angiogenesis and vascular cell survival, *Chem Biol* 3, 881-885.
172. Kerr, J. S., Wexler, R. S., Mousa, S. A., Robinson, C. S., Wexler, E. J., Mohamed, S., Voss, M. E., Devenny, J. J., Czerniak, P. M., Gudzelak, A., Jr., and Slee, A. M. (1999) Novel small molecule alpha v integrin antagonists: comparative anti-cancer efficacy with known angiogenesis inhibitors, *Anticancer Res* 19, 959-968.
173. Carron, C. P., Meyer, D. M., Pegg, J. A., Engleman, V. W., Nickols, M. A., Settle, S. L., Westlin, W. F., Ruminski, P. G., and Nickols, G. A. (1998) A peptidomimetic antagonist of the integrin alpha(v)beta3 inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy, *Cancer Res* 58, 1930-1935.
174. Lode, H. N., Moehler, T., Xiang, R., Jonczyk, A., Gillies, S. D., Cheresh, D. A., and Reisfeld, R. A. (1999) Synergy between an antiangiogenic integrin alphav antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1591-1596.
175. Boney, W., Hiran, F. Gillart, G. (2004) Protein disulfide isomerase, *Biochemica biophysica acta* 1699, 35.

176. Appenzeller-Herzog, C., and Ellgaard, L. (2008) The human PDI family: versatility packed into a single fold, *Biochim Biophys Acta* 1783, 535-548.
177. Hatahet, F., and Ruddock, L. W. (2009) Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation, *Antioxid Redox Signal* 11, 2807-2850.
178. Gruber, C. W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J. L., and Craik, D. J. (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding, *Trends Biochem Sci* 31, 455-464.
179. Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., and Ferraro, A. (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions, *J Cell Physiol* 193, 154-163.
180. Jordan, P. A., and Gibbins, J. M. (2006) Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function, *Antioxid Redox Signal* 8, 312-324.
181. Terada, K., Manchikalapudi, P., Noiva, R., Jauregui, H. O., Stockert, R. J., and Schilsky, M. L. (1995) Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes, *J Biol Chem* 270, 20410-20416.
182. Tager, M., Kroning, H., Thiel, U., and Ansorge, S. (1997) Membrane-bound protein disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells, *Exp Hematol* 25, 601-607.
183. Desilva, M. G., Lu, J., Donadel, G., Modi, W. S., Xie, H., Notkins, A. L., and Lan, M. S. (1996) Characterization and chromosomal localization of a new protein disulfide isomerase, PDIp, highly expressed in human pancreas, *DNA Cell Biol* 15, 9-16.
184. Goplen, D., Wang, J., Enger, P. O., Tysnes, B. B., Terzis, A. J., Laerum, O. D., and Bjerkvig, R. (2006) Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma, *Cancer Res* 66, 9895-9902.
185. Essex, D. W., and Li, M. (2003) Redox control of platelet aggregation, *Biochemistry* 42, 129-136.
186. Essex, D. W., Miller, A., Swiatkowska, M., and Feinman, R. D. (1999) Protein disulfide isomerase catalyzes the formation of disulfide-linked complexes of vitronectin with thrombin-antithrombin, *Biochemistry* 38, 10398-10405.
187. Gallina, A., Hanley, T. M., Mandel, R., Trahey, M., Broder, C. C., Viglianti, G. A., and Ryser, H. J. (2002) Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry, *J Biol Chem* 277, 50579-50588.
188. Abell, B. A., and Brown, D. T. (1993) Sindbis virus membrane fusion is mediated by reduction of glycoprotein disulfide bridges at the cell surface, *J Virol* 67, 5496-5501.
189. Markovic, I., Pulyaeva, H., Sokoloff, A., and Chernomordik, L. V. (1998) Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates, *J Cell Biol* 143, 1155-1166.
190. Abou-Jaoude, G., and Sureau, C. (2007) Entry of hepatitis delta virus requires the conserved cysteine residues of the hepatitis B virus envelope

- protein antigenic loop and is blocked by inhibitors of thiol-disulfide exchange, *J Virol* 81, 13057-13066.
191. Jain, S., McGinnes, L. W., and Morrison, T. G. (2009) Role of thiol/disulfide exchange in newcastle disease virus entry, *J Virol* 83, 241-249.
 192. Mirazimi, A., and Svensson, L. (1998) Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7, *J Virol* 72, 3887-3892.
 193. Chen, J. Z., Settembre, E. C., Aoki, S. T., Zhang, X., Bellamy, A. R., Dormitzer, P. R., Harrison, S. C., and Grigorieff, N. (2009) Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10644-10648.
 194. Patton, J. T., Hua, J., and Mansell, E. A. (1993) Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4, *J Virol* 67, 4848-4855.
 195. Lovat, P. E., Corazzari, M., Armstrong, J. L., Martin, S., Pagliarini, V., Hill, D., Brown, A. M., Piacentini, M., Birch-Machin, M. A., and Redfern, C. P. (2008) Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress, *Cancer Res* 68, 5363-5369.
 196. Fonseca, C., Soiffer, R., Ho, V., Vanneman, M., Jinushi, M., Ritz, J., Neubergh, D., Stone, R., DeAngelo, D., and Dranoff, G. (2009) Protein disulfide isomerases are antibody targets during immune-mediated tumor destruction, *Blood* 113, 1681-1688.
 197. Hoffman, R., Furie, B., McGlave. . (2008) Hematology. Basic Principles and practice., *Hematology 4 ed* 63-68.
 198. Armstrong, S. A., and Look, A. T. (2005) Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia, *J Clin Oncol* 23, 6306-6315.
 199. Abbasi, S., Maleha, F., and Shobaki, M. (2013) Acute lymphoblastic leukemia experience: epidemiology and outcome of two different regimens, *Mediterr J Hematol Infect Dis* 5, e2013024.
 200. Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1981) The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations, *Br J Haematol* 47, 553-561.
 201. Ravindranath, Y. (2003) Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia, *Curr Opin Oncol* 15, 23-35.
 202. Chan, K. W. (2002) Acute lymphoblastic leukemia, *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 32, 40-49.
 203. Redaelli, A., Laskin, B. L., Stephens, J. M., Botteman, M. F., and Pashos, C. L. (2005) A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL), *Eur J Cancer Care (Engl)* 14, 53-62.
 204. Ziegler, D. S., Dalla Pozza, L., Waters, K. D., and Marshall, G. M. (2005) Advances in childhood leukaemia: successful clinical-trials research leads to individualised therapy, *Med J Aust* 182, 78-81.
 205. Piñeros, M., Pardo, C., Otero, J., Suarez, A., Vizcaino, M. (2008) Protocolo de vigilancia centinela en salud pública de las leucemias agudas

- pediátricas., *Instituto Nacional de Salud, Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología* 2008.
206. Rubnitz, J. E., and Pui, C. H. (2003) Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Cancer Treat Rev* 29, 31-44.
 207. Belson, M., Kingsley, B., and Holmes, A. (2007) Risk factors for acute leukemia in children: a review, *Environ Health Perspect* 115, 138-145.
 208. Pombo-de-Oliveira, M. S., and Koifman, S. (2006) Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 2336-2341.
 209. Sakajiri, S., Mori, K., Isobe, Y., Kawamata, N., and Oshimi, K. (2002) Epstein-Barr virus-associated T-cell acute lymphoblastic leukaemia, *Br J Haematol* 117, 127-129.
 210. Slater, D. N. (2002) The new World Health Organization classification of haematopoietic and lymphoid tumours: a dermatopathological perspective, *Br J Dermatol* 147, 633-639.
 211. Bhatnagar, S., Chandra, J., and Narayan, S. (2002) Hematological changes and predictors of bone marrow recovery in patients with neutropenic episodes in acute lymphoblastic leukemia, *J Trop Pediatr* 48, 200-203.
 212. Kuriyama, K. (2003) [FAB and WHO classification of leukemia], *Nihon Naika Gakkai Zasshi* 92, 934-941.
 213. Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N. . (2009) WHO classification of tumor of hematopoietic and lymphoid tissues, *IARC Press*, 109-138.
 214. Dock, G. e. a. (1904) Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma, *Am J Med Sci*, 127-563.
 215. DePace, N. (1912) Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica, *Ginecologia* 9, 82-89.
 216. Calderón, M. N., Acosta, O., Guerrero, C. A., Guaman, F. . (2008) Protein isulfide isomerase activity is involved in rotavirus entry to MA104 cells, *Proceeding of the Xiv International congress of virology Instambul*, 1632-1664.
 217. Guo, W., and Giancotti, F. G. (2004) Integrin signalling during tumour progression, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826.
 218. Arrigo, A. P. (2012) Editorial: heat shock proteins in cancer, *Curr Mol Med* 12, 1099-1101.
 219. Silva, E., Guerrero, C., Acosta, O. (2012) Potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de linfoma histiocítico humano U937, *Tesis de Maestría en genética humana. Universidad Nacional de Colombia. 1.*
 220. Alfonso, E., Rodríguez, S. Guerrero, C. (2012) Interacción de las proteínas de choque termico Hsp90 y Hsp70 con aislamientos de rotavirus en las líneas celulares U937, *Tesis de pregrado licenciatura en Biología. Universidad Distrital Frnsisco José de Caldas. 1.*
 221. Guerrero, R., Guerrero, C. (2012) Determinación del potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de cáncer de mieloma murino sp2/0-ag14, *Tesis*

- de Maestría en Bioquímica. Facultad de medicina. Universidad Nacional de Colombia. 1.
222. Guerrero, C. A., Santana, A. Y., and Acosta, O. (2010) Mouse intestinal villi as a model system for studies of rotavirus infection, *J Virol Methods* 168, 22-30.
 223. Guerrero, C. A., Torres, D. P., Garcia, L. L., Guerrero, R. A., and Acosta, O. (2014) N-Acetylcysteine treatment of rotavirus-associated diarrhea in children, *Pharmacotherapy* 34, e333-340.
 224. Arnold, M., Patton, J. T., and McDonald, S. M. (2009) Culturing, storage, and quantification of rotaviruses, *Curr Protoc Microbiol Chapter 15*, Unit 15C 13.
 225. Groene, W. S., and Shaw, R. D. (1992) Psoralen preparation of antigenically intact noninfectious rotavirus particles, *J Virol Methods* 38, 93-102.
 226. Berry, M. J., and Samuel, C. E. (1982) Detection of subnanogram amounts of RNA in polyacrylamide gels in the presence and absence of protein by staining with silver, *Anal Biochem* 124, 180-184.
 227. Jones, R. W., Ross, J., and Hoshino, Y. (2003) Identification of parental origin of cognate dsRNA genome segment(s) of rotavirus reassortants by constant denaturant gel electrophoresis, *J Clin Virol* 26, 347-354.
 228. WHO. World Health Organization. Expanded Programme on Immunization of the Department of Immunization, V. a. B. (2009) Manual of rotavirus detection and characterization methods, *WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland. WHO/IVB/08.17*.
 229. Campbell, S. A., and Gromeier, M. (2005) Oncolytic viruses for cancer therapy II. Cell-internal factors for conditional growth in neoplastic cells, *Onkologie* 28, 209-215.
 230. Campbell, S. A., and Gromeier, M. (2005) Oncolytic viruses for cancer therapy I. Cell-external factors: virus entry and receptor interaction, *Onkologie* 28, 144-149.
 231. Carreno-Torres, J. J., Gutierrez, M., Arias, C. F., Lopez, S., and Isa, P. (2010) Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection, *Virology* 407, 349-359.
 232. Eichwald, C., Rodriguez, J. F., and Burrone, O. R. (2004) Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation, *J Gen Virol* 85, 625-634.
 233. Offit, P. A., Clark, H. F., Taylor, A. H., Hess, R. G., Bachmann, P. A., and Plotkin, S. A. (1984) Rotavirus-specific antibodies in fetal bovine serum and commercial preparations of serum albumin, *J Clin Microbiol* 20, 266-270.
 234. Sato, K., Inaba, Y., Tokuhisa, S., Miura, Y., Akashi, H., and Tanaka, Y. (1980) Antibodies against several viruses in sera from normal bovine fetuses and precolostral calves, *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 20, 77-78.
 235. Estes, M. K., Graham, D. Y., Gerba, C. P., and Smith, E. M. (1979) Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures, *J Virol* 31, 810-815.
 236. Chaibi, C., Cotte-Laffitte, J., Sandre, C., Esclatine, A., Servin, A. L., Quero, A. M., and Geniteau-Legendre, M. (2005) Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells, *Virology* 332, 480-490.

237. Bautista, D., Rodriguez, L. S., Franco, M. A., Angel, J., and Barreto, A. (2015) Caco-2 cells infected with rotavirus release extracellular vesicles that express markers of apoptotic bodies and exosomes, *Cell Stress Chaperones* 20, 697-708.
238. Perez, J. F., Chemello, M. E., Liprandi, F., Ruiz, M. C., and Michelangeli, F. (1998) Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration, *Virology* 252, 17-27.
239. Halasz, P., Holloway, G., and Coulson, B. S. (2010) Death mechanisms in epithelial cells following rotavirus infection, exposure to inactivated rotavirus or genome transfection, *J Gen Virol* 91, 2007-2018.
240. Holloway, G., Johnson, R. I., Kang, Y., Dang, V. T., Stojanovski, D., and Coulson, B. S. (2015) Rotavirus NSP6 localizes to mitochondria via a predicted N-terminal α -helix, *J Gen Virol* 96, 3519-3524.
241. Bhowmick, R., Halder, U. C., Chattopadhyay, S., Chanda, S., Nandi, S., Bagchi, P., Nayak, M. K., Chakrabarti, O., Kobayashi, N., and Chawla-Sarkar, M. (2012) Rotaviral enterotoxin nonstructural protein 4 targets mitochondria for activation of apoptosis during infection, *J Biol Chem* 287, 35004-35020.
242. Martin-Latil, S., Mousson, L., Autret, A., Colbere-Garapin, F., and Blondel, B. (2007) Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway, *J Virol* 81, 4457-4464.
243. Bhowmick, R., Halder, U. C., Chattopadhyay, S., Nayak, M. K., and Chawla-Sarkar, M. (2013) Rotavirus-encoded nonstructural protein 1 modulates cellular apoptotic machinery by targeting tumor suppressor protein p53, *J Virol* 87, 6840-6850.
244. Guerrero, C. A., and Acosta, O. (2016) Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection, *World J Virol* 5, 38-62.
245. Gutierrez, M., Isa, P., Sanchez-San Martin, C., Perez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F., and Lopez, S. (2010) Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis, *J Virol* 84, 9161-9169.
246. Dutta, D., Bagchi, P., Chatterjee, A., Nayak, M. K., Mukherjee, A., Chattopadhyay, S., Nagashima, S., Kobayashi, N., Komoto, S., Taniguchi, K., and Chawla-Sarkar, M. (2009) The molecular chaperone heat shock protein-90 positively regulates rotavirus infection, *Virology* 391, 325-333.
247. Nomaguchi, M., Fujita, M., Miyazaki, Y., and Adachi, A. (2012) Viral tropism, *Front Microbiol* 3, 281.
248. Zhu, Y. Z., Cao, M. M., Wang, W. B., Wang, W., Ren, H., Zhao, P., and Qi, Z. T. (2012) Association of heat-shock protein 70 with lipid rafts is required for Japanese encephalitis virus infection in Huh7 cells, *J Gen Virol* 93, 61-71.
249. Cripe, T. P., Delos, S. E., Estes, P. A., and Garcea, R. L. (1995) In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins, *J Virol* 69, 7807-7813.

250. Chromy, L. R., Pipas, J. M., and Garcea, R. L. (2003) Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10477-10482.
251. Niewiarowska, J., D'Halluin, J. C., and Belin, M. T. (1992) Adenovirus capsid proteins interact with HSP70 proteins after penetration in human or rodent cells, *Exp Cell Res* 201, 408-416.
252. Fust, G., Beck, Z., Banhegyi, D., Kocsis, J., Biro, A., and Prohaszka, Z. (2005) Antibodies against heat shock proteins and cholesterol in HIV infection, *Mol Immunol* 42, 79-85.
253. McDonald, S. M., and Patton, J. T. (2011) Assortment and packaging of the segmented rotavirus genome, *Trends Microbiol* 19, 136-144.
254. Iturriza Gomara M, D. U. a. G. J. (2003) Molecular epidemiology of rotaviruses: genetic mechanisms associated with diversity., *Perspectives in Medical Virology. Viral gastroenteritis. Desselberger U, Gray J, editors; Elsevier Science*. 9, 27.
255. Yate., G. C. C. (2014) Distribución de genotipos de rotavirus del grupo a en once departamentos de Colombia posterior a la introducción de la vacuna anti-rotavirus, 2009 – 2013., *Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Maestría en Microbiología. Bogotá, Colombia*, 114.