



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Análisis de la unión del rotavirus a los glóbulos rojos y el efecto que tiene dicha unión en la capacidad infecciosa en líneas tumorales.**

**Liliana Martín Bautista**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias

Bogotá, Colombia

2015

# **Análisis de la unión del rotavirus a los glóbulos rojos y el efecto que tiene dicha unión en la capacidad infecciosa en líneas tumorales.**

**LILIANA MARTÍN BAUTISTA**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Ciencias, Microbiología**

Director

Ph.D., CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA

Línea de Investigación:

Virus oncolítico

Grupo de Investigación:

Biología Molecular de Virus

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias

Bogotá, Colombia

2015

**A mi madre y hermana por todo su apoyo, paciencia y cariño. Las amo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer con especial cariño al Doctor Carlos Arturo Guerrero Fonseca, por ser mi director de tesis, su gran calidad científica y humana han sido fundamentales en mi formación como investigadora. Le agradezco profundamente su generosidad al compartir conmigo sus conocimientos y sus enseñanzas, tanto personales como académicas. Además le agradezco la paciencia y el tiempo invertido en el desarrollo de este trabajo. Gracias por escucharme y por todos sus consejos. Profe, quiero que sepa que más que un director usted es un amigo.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por hacer agradable y entretenido el laboratorio. A Erika y Nata por permitir reirme de ustedes y con ustedes. Quiero agradecer especialmente a Rafis por estar siempre dispuesto a aclarar mis dudas, por las preguntas que aportaron al desarrollo de mi trabajo y por su paciencia.

A mis compañeras de maestría, Astrid, Carito y Vane por brindarme su amistad desinteresada, por el apoyo en aquellas sesiones de estudio y por el ejemplo que son para mi vida personal y profesional.

También me gustaría agradecer a mis profesores, los cuales han aportado con mi formación, y en especial a la profe Marta Fontanilla por sus enseñanzas.

A la Universidad Nacional de Colombia, por la oportunidad que me brindó de realizar la maestría, a Socorrito por su inmensa ayuda en todas las dudas con las que siempre llegaba a su oficina.

A Sergio y a Eimy por su ayuda con el documento.

Deseo también expresar todo mi agradecimiento a mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de este trabajo. Por último, dar las gracias a mis amigos y compañeros de trabajo que, de un modo u otro, han respaldado este esfuerzo

## Resumen

Los virus oncolíticos (VO) son una alternativa prometedora para el tratamiento del cáncer. Estos virus se caracterizan por ser partículas no patógenas que infectan específicamente células cancerosas provocando su muerte, mientras que no afectan los tejidos sanos. El grupo de biología molecular de virus de la Universidad Nacional de Colombia ha realizado trabajos que evalúan la capacidad oncolítica del rotavirus. Inicialmente se seleccionaron 5 aislados de rotavirus, que fueron cultivados en líneas celulares tumorales. Estos virus presentaron un tropismo por células que expresaran las proteínas de choque térmico (HSP), la integrina  $\alpha\beta3$  y la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Como las PDI o las HSPs (incluida Hsc70) no se expresan en la membrana de células del tejido normal y sí en neoplasias, se planteó la posibilidad de usar el rotavirus en tumores donde estos receptores se expresen.

Siguiendo las recomendaciones de "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, se realizaron estudios en modelos *in vitro* para determinar las características replicativas diferenciales de los virus en tejido neoplásico. Para esto se usaron las líneas celulares de leucemia mieloide humana U937, leucemia linfocítica aguda REH, cancer de estómago KATO III, cáncer de pulmón A549, cáncer de mama MCF-7, mieloide de ratón Sp2/0-Ag14 y cultivos primarios de leucemias humanas. Como control se utilizaron células normales no tumorales.

Se determinó si las células tumorales analizadas expresan HSPs y si los rotavirus utilizan estas moléculas celulares, junto con PDI y la integrina  $\beta3$ , durante el proceso infeccioso. En conclusión, los aislados de rotavirus obtenidos en nuestro laboratorio infectaron y lisaron las líneas celulares tumorales examinadas; el ingreso a la célula se realizó utilizando las HSPs (Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60 o Hsp40), PDI y la integrina  $\alpha\beta3$  de membrana citoplasmática, sugiriendo que han adquirido ganancia de función al utilizar proteínas de choque térmico (HSPs).

Los virus oncolíticos pueden ser administrados vía intravenosa; sin embargo, se conoce que algunos rotavirus tienen la capacidad de aglutinar los glóbulos rojos (hemaglutinación). En caso de aplicarse los aislamientos rotavirales utilizados en este trabajo a animales o humanos, eso sería un inconveniente porque podrían desencadenar

tromboembolismo, al menos teóricamente. Otro riesgo que se corre es el “secuestro” de los virus por las células del torrente sanguíneo, que impedirían su llegada al tumor.

Por lo anterior, era indispensable determinar si los aislamientos rotavirales con actividad oncolítica presentaban hemaglutinación, si se unían a los glóbulos rojos y si dicha unión interfería con la infección a células tumorales. Para abordar el problema, se realizó el ensayo de hemoaglutinación, teniendo como referencia los virus patrón que dieron origen a los aislamientos y la proteína VP8 del rotavirus hemaglutinante RRV. Se encontró que los aislamientos rotavirales no tienen capacidad hemaglutinante aunque TRUY y WTEW presentaron ligera hemaglutinación con las mayores concentraciones. Este efecto habrá que tenerse en cuenta en los estudios *in vivo* para determinar si impiden su uso o no como virus oncolítico. En un segundo ensayo se encontró que los aislamientos se unen a los glóbulos rojos y que dicha unión no impide la infección a las células tumorales. Se evaluó posteriormente la infección de los virus incubados con las glicoproteínas solubles presentes en el suero fetal bovino (SFB), las membranas citoplasmáticas de los glóbulos rojos o la glicoproteína mayoritaria en los glóbulos rojos, la glicoforina; esta unión tampoco impidió la infección a las células tumorales. Especulamos que la afinidad de los rotavirus por los receptores celulares en las células tumorales es mayor que la presentada por en la unión a los glóbulos rojos.

**Palabras claves:** Rotavirus, Virus Oncolítico, Glóbulos Rojos, Ácido Siálico, Hemaglutinación.

## Abstract

Oncolytic viruses (OV) emerge as a promising alternative for the treatment of cancer. These viruses are characterized by being non pathogenic particles that specifically infect cancerous cells causing their death, not affecting healthy tissues. The group of molecular biology of viruses of the National University of Colombia has made some work to assess the oncolytic capacity of the rotavirus. Initially, 5 isolates of the rotavirus were selected and cultured on tumor cellular lines, these viruses presented a tropism by cells that will express the Heat Shock Proteins (HSP), the integrin  $\alpha V\beta 3$  and the protein disulfide isomerase PDI. As PDI or HSPs, including Hsc70, are not expressed in the membrane of the cells of normal tissue, as they do in the neoplasm; there was the suggestion of the possibility to use the rotavirus in tumors where these receptors would express themselves.

Following the recommendation of "The international conference on harmonization of technical requirement for registration of pharmaceuticals for human use", (ICH) in relation to the design and use of viral oncolytic agents, studies on in vitro models were carried out to define the differential replicative characteristics of the viruses in neoplastic tissue. For this, cellular lines of myeloid leukemia U937, acute lymphoblastic leukemia REH, stomach cancer KATO III, lung cancer A549, breast cancer MCF-7, mouse myeloid Sp 2/0- Ag14 and primary cultures of human leukemia were used. Non- tumor normal cells were used as regulators. It was determined if the analyzed tumor cells express HSPs and if the rotavirus uses these cellular molecules, with PDI and the  $\beta 3$  integrin, during the infectious process. In conclusion, the isolates of rotavirus obtained in our laboratory infected and lysed the examined tumor cellular lines; the entry to the cell was made using the HSPs (Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60 o Hsp40), PDI and the integrin of cytoplasmic membrane, suggesting they have acquired gain of function by using Heat Shock Proteins (HSPs).

Oncolytic viruses can be administered by intravenous way, however it's known that some rotavirus have the ability to agglutinate red blood cells (hemagglutination). In case of applying the rotaviral isolates used in this work to animals or humans could be an inconvenient because they could trigger a thromboembolism, theoretically at least. Another risk is the 'sequestration' of viruses by bloodstream cells that would block their arrival to the tumor. For these reasons, it was essential to determine if the rotaviral isolates, with oncolytic activity, presented hemagglutination if they join to the red blood cells and if that union interfered with the infection of tumor cells. To approach to the problem a test of

hemagglutination was carried out, having as reference the pattern viruses that gave origin to the isolates and the VP8 protein of the hemagglutinating virus RRV. It was found that the rotaviral isolates don't have the hemagglutinating capacity in its basics, though TRUY and WTEW presented a slight hemagglutination with higher concentrations. This effect will have to be taken into account in the in vivo studies to determine if they blocked their use or not, as an oncolytic virus. In the second test it was found that the isolates bind to the red blood cells and that this binding doesn't block the infection to the tumor cells. Later, there was an evaluation on the infection of incubated viruses with the soluble glycoprotein present in the bovine fetal serum (BFS), the cytoplasmatic membranes of the red blood cells or the major glycoprotein in the red blood cells, the glycophorin; this bind didn't either prevent the infection of the tumor cells. We speculate that the affinity of the rotaviruses by the cellular receptors is higher than the one presented by the sugars of the red blood cells.

**Key words:** Rotavirus, Oncolytic viruses, Red Blood Cell, Sialic acid, hemagglutination.

## Contenido

Resumen .....	V
Abstract .....	VII
Lista de figuras .....	XI
Lista de tablas .....	XII
Lista de abreviaturas .....	XIII
Introducción .....	15
1. MARCO TEORICO.....	17
1.1. Características generales de rotavirus.....	17
1.1.1. Patogénesis.....	19
1.1.2. Proteínas estructurales.....	19
1.1.3. Proteínas no estructurales .....	20
1.1.4. Entrada del rotavirus a la célula.....	22
1.1.5. Ciclo replicativo del rotavirus .....	23
1.2. Rol del ácido siálico en la infección de rotavirus.....	25
1.3. Virus oncolítico .....	33
1.3.1 Células transportadoras de virus oncolítico.....	39
1.4. Rotavirus como virus oncolítico .....	41
1.5. Glóbulos rojos.....	43
2. PLANEACIÓN GENERAL.....	44
2.1. Formulación del Problema.....	44
2.2. Justificación .....	45
2.3. Objetivos.....	46
2.3.1. Objetivo general.....	46
2.3.2. Objetivos específicos.....	46
3. METODOLOGÍA.....	47
3.1. Líneas celulares.....	47
3.2. Anticuerpos y reactivos.....	47
3.3. Cepas rotavirales.....	48
3.4. Purificación de TLP.....	49
3.5. Expresión celular de la proteína verde fluorescente .....	49
3.6. Purificación de glóbulos rojos.....	50
3.7. Test de hemaglutinación .....	50

3.8. Ensayo de unión de los rotavirus a los glóbulos rojos.....	51
3.9. Inmunofluorescencia .....	51
3.10. Citometría de flujo.....	52
3.11. Infección de líneas tumorales con rotavirus unido a glóbulos rojos .....	52
3.12. Aislamiento de fracciones enriquecidas de membranas citoplasmáticas de glóbulos rojos.....	54
3.13. Infección de la línea tumoral MCF-7 con rotavirus unido a glicoforina A o a suero fetal bovino.....	55
3.14. Determinar la infección del rotavirus O-Ecwt en tejido normal al aplicarlo vía endovenosa a un ratón.....	56
4. RESULTADOS.....	57
4.1. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY hemaglutinan parcialmente.....	57
4.2. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y O- ECwt se unen a los glóbulos rojos .....	58
4.3. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y O-Ecwt unidos a los glóbulos rojos, infectan células tumorales REH, SP2/O-Ag14 y MCF-7.....	61
4.4. La unión de los aislamientos rotavirales a glicoproteínas no impide la infección de células tumorales .....	65
4.5. El aislamientos rotaviral O-ECwt no infectan los tejidos normales de ratones ICR adultos.....	68
5. DISCUSIÓN.....	71
6. CONCLUSIONES.....	76
7. RECOMENDACIONES.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	78

## Lista de figuras

Figura 1-1. Estructura de las partículas de rotavirus (TLP).

Figura 1-2. Clasificación del rotavirus.

Figura 1-3. Ciclo replicativo del rotavirus.

Figura 1-4. Familia de ácidos siálicos presentes en la naturaleza

Figura 1-5. Características estructurales de la Proteína VP8.

Figura 1-6. Vías de biosíntesis de gangliósidos y acción de la neuraminidasa.

Figura 1-7. Virus oncolítico.

Figura 1-8. Obstáculos en la entrega exitosa de los virus oncolíticos a las células tumorales

Figura 1-9.

Figura 4-1. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY hemaglutinan parcialmente; los aislamientos Wt1-5, WWM y O- ECwt no aglutinan los glóbulos rojos.

Figura 4-2. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y O-ECwt se unen a los glóbulos rojos.

Figura 4-3. La unión de los aislados rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y O- Ecwt a los glóbulos rojos no afecta su capacidad infecciosa.

Figura 4-4. La unión del rotavirus a los azúcares no afecta la capacidad infecciosa de los aislados rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y O-Ecwt.

Figura 4-5. El aislamiento rotaviral O-ECwt no infecta los tejidos normales del ratón.

## **Lista de tablas**

Tabla 1-1. Resumen de la actividad hemaglutinante de las cepas rotavirales

Tabla 1-2 Secuencia de la alineación de las regiones VP4 que contienen los aminoácidos implicados en la unión a ácidos siálicos

Tabla 3-1. Reactivos

Tabla 4-1. Porcentaje de infección de los aislamientos rotavirales incubados con SFB, Fracciones de membrana y Glicoforina A

## Lista de Abreviaturas

### Abreviatura Término

---

Ad	Adenovirus
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Ácido siálico
ATCC	American Type Culture Collection
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DLP	Partícula viral de doble capa
DMEM	Medio de cultivo celular Dulbecco's modified Eagle's médium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido Ditionitrobenzoico
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
GalNAc	N-acetil galactosamina
GFP	Proteína verde fluorescente
GR	Glóbulo rojo
HA	hemaglutinante
h.p.i	Horas postinfección
HSPs	Proteínas de choque térmico.
HSV-1	Virus del herpes simple 1
MYXV	Virus mixoma
NAC	N-acetil cisteína
NA	Neuraminidasa
NDV	Virus de la enfermedad de Newcastle

## Abreviatura Término

---

NSP	Proteína no estructural
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PABP	Proteína de unión al poli A
PDI	Proteína disulfuro isomerasa.
RE	Retículo endoplasmático
SVV	Virus del Valle de Séneca
Sp2/0 Ag 14	Línea celular de mieloma murino
TLP	Partícula viral de triple capa
TRUY	Aislado rotaviral producto de mezclar las cepas TRF, RRV, UK y YM
VO	Los virus oncolíticos
VP	Proteína Viral
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
Wt1-5	Aislado rotaviral producto de mezclar las cepas TRF, RRV, UK y YM.
WTEW	Aislado rotaviral producto de mezclar las cepas WWM, TRUY, O-ECwt y Wt1-5
WWM	Aislado rotaviral producto de mezclar las cepas Wa, Wi y M69
$\alpha$ V $\beta$ 3	Integrina alfa V beta 3

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos provocando finalmente la muerte del individuo (Muñoz, 1997). El cáncer constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial, ocasionando 7,6 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total) ocurridas en todo el mundo en 2008. Los tipos de cáncer más comunes son los de pulmón, estómago, hígado, colon y mama.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de bajos ingresos. Estas cifras permiten pronosticar que el número de defunciones por cáncer seguirá aumentando en todo el mundo y superará los 13,1 millones en 2030.

Aunque los tratamientos para la enfermedad han mejorado de manera significativa, la quimioterapia o radioterapia convencionales aún tienen efectos limitados contra muchas formas de cáncer, sin mencionar una gran cantidad de efectos secundarios relacionados con el tratamiento (Kelly y Russell, 2007).

La búsqueda de estrategias terapéuticas ha permitido encontrar en los virus una nueva clase de agente contra el cáncer. La capacidad de los virus para matar las células cancerosas ha sido reconocida desde hace más de un siglo, cuando se observó una regresión de los cánceres en pacientes que habían adquirido virus naturalmente. Estas observaciones proporcionaron la base para los primeros ensayos clínicos que consistían en administrar a los pacientes fluidos corporales con partículas virales; sin embargo, estos ensayos se abandonaron temporalmente debido a la toxicidad que se presentaba (Southam y Moore, 1952).

El interés por los virus como tratamiento para el cáncer resurgió en la década de los noventas. El desarrollo de tecnologías de ingeniería genética moderna permitió modificar los virus para mejorar la selectividad hacia el tejido tumoral (Meerani y Yao, 2010). Los virus oncolíticos son virus que han sido seleccionados o diseñados terapéuticamente para infectar y dañar selectivamente las células cancerosas sin causar daño a las células normales. Los mecanismos anticancerosos utilizados por estos virus incluyen la lisis directa, la apoptosis, la expresión de proteínas tóxicas, la autofagia, la interrupción de

síntesis de proteínas y la inducción de la inmunidad antitumoral (Wong *et al.*, 2010; Breitbach *et al.*, 2007).

Modelos *in vitro* han comprobado estos efectos, pero *in vivo* la situación es compleja: diversas barreras en la entrega del virus comprometen su eficacia. En algunas ocasiones, las partículas virales administradas sistémicamente son neutralizadas en la sangre por los anticuerpos, se unen a las células sanguíneas y/o se compactan con las células normales del hígado. Por lo anterior, la dosis eficaz del virus oncolítico que llega al tumor es significativamente menor a la dosis administrada (Willmon *et al.*, 2009).

Tales barreras se pueden superar si se encuentran mecanismos para recubrir el virus sin que pierda capacidad de localizar el tumor (poliaminas, reactivos químicos utilizados para hacer nanopartículas, introduciéndolos intracelularmente al estilo “caballo de Troya”, entre otros) o aplicándolo directamente dentro del tumor (Reddy *et al.*, 2007). A pesar de las limitantes que se presentan en la actualidad, la oncoterapia viral tiene un amplio potencial para ser usada en el tratamiento contra el cáncer; para ello, es necesario analizar estrictos criterios de seguridad y eficacia: su capacidad infecciosa, capacidad lítica, mecanismos de muerte celular y selectividad, entre otros. El análisis de la selectividad incluye determinar la capacidad infecciosa a células tumorales y no tumorales para evaluar indirectamente la seguridad del virus candidato a oncolítico.

Estudios realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, han encontrado que cinco aislamientos rotavirales obtenidos en el laboratorio infectan y lisan las líneas celulares: Sp40 Ag-14 (mieloma de ratón), U-937 (linfoma histiocítico), REH (leucemia linfocítica aguda), Kato III (carcinoma gástrico), J774 (sarcoma de células reticulares), MDA y MCF-7 (adenocarcinoma de mama), PC3 (adenocarcinoma grado IV de próstata), sugiriendo que las cepas estudiadas son potenciales virus oncolíticos.

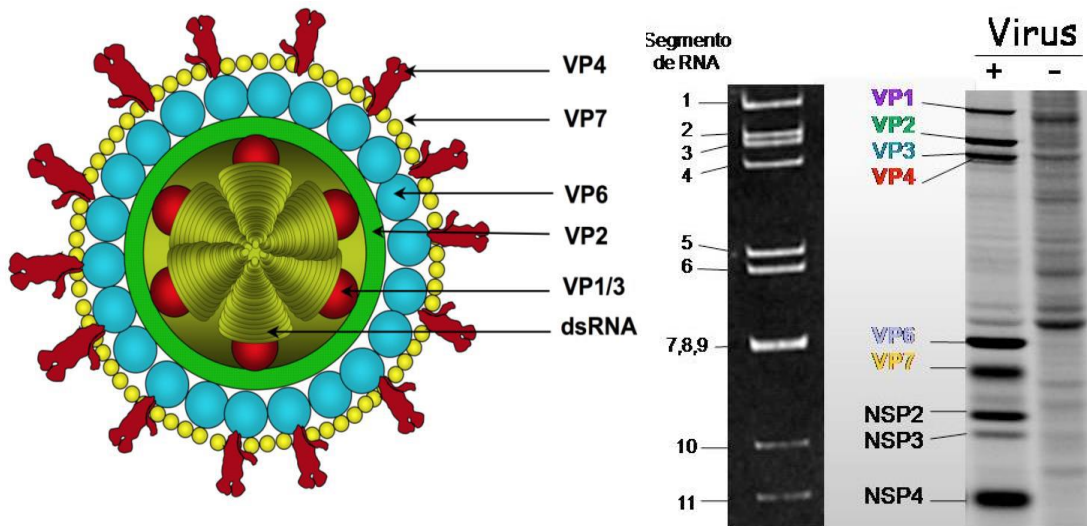
Sin embargo, no se ha determinado la capacidad de unión a glóbulos rojos y si dicha unión interfiere con la capacidad infecciosa a células tumorales o no tumorales. Por esta razón, este trabajo pretende analizar si los rotavirus en estudio se unen a los glóbulos rojos y si esto afecta la capacidad infecciosa a células tumorales *in vitro* o a células no tumorales en un animal vivo.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ROTAVIRUS

Rotavirus constituye un género dentro de la familia Reoviridae, de tamaño mediano (70 nm) y es un virus sin envoltura lipídica. La partícula madura está compuesta por tres capas concéntricas. La capa externa contiene dos proteínas (VP4 y VP7), mientras que la capa intermedia está formada por VP6 y la interior por VP2, que encierra otras dos proteínas, VP1 y VP3.

El genoma viral consiste de 11 segmentos de ARN de doble cadena, que codifica seis proteínas estructurales (VP1-VP7) (del inglés *Viral protein*) y seis proteínas no estructurales (NSP1-NSP6) (del inglés *nonstructural protein*) (24-26). Las partículas virales con las tres capas proteicas concéntricas (TLPs) (del inglés *Triple-Layered Particle*) son infecciosas, mientras que aquellas no infecciosas poseen sólo dos capas (DLPs) (del inglés *Double-Layered Particle*) (Acosta *et al.*, 2009). (Figura 1-1)

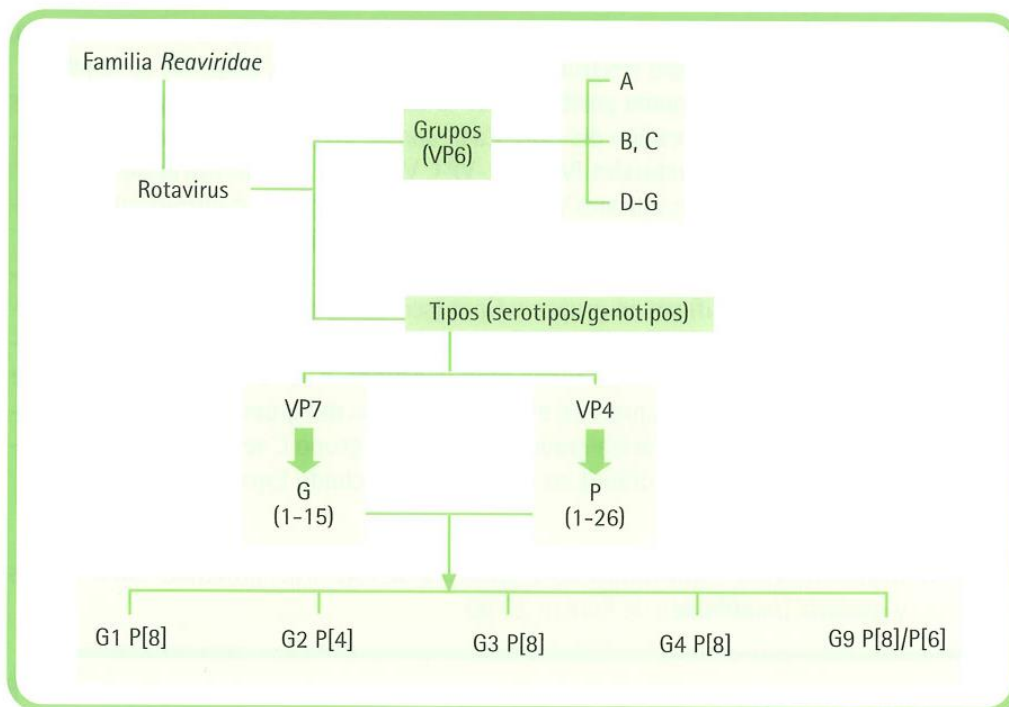


**Figura 1-1. Estructura de las partículas de rotavirus (TLP).** Las partículas virales maduras poseen una cápside compuesta por tres capas proteicas concéntricas. La capa externa esta conformada por las proteínas VP4 (en rojo) y VP7 (en amarillo); la capa intermedia está formada por VP6 (en azul) y la capa interior por VP2 (en verde). Los segmentos de ARN de doble cadena (líneas en marrón) se ubican en el interior del núcleo

asociado al complejo de la polimerasa de ARN VP1 y VP3 (esferas rojas) (58). **B)** Electroforesis del genoma viral; **C)** Proteínas marcadas de células infectadas (+) o no (-) con rotavirus (Tomado de Rojas *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2009, modificado).

Los rotavirus se clasifican en grupos y tipos (serotipos/genotipos) según las propiedades antigénicas de las proteínas. La proteína VP6 es la determinante de la reactividad de grupo. Actualmente se reconocen 7 grupos, de A-G. Los grupos que afectan a los humanos son el A, B y C. El grupo A afecta al ser humano en general; el B ha sido identificada en algunos brotes epidémicos de diarrea grave en adultos; mientras que el C se ha detectado en casos de diarrea esporádica infantil (Rojas y López, 2008).

La clasificación en tipos se hace según las proteínas de la cápside externa VP7, glicoproteína que determina la especificidad de tipo G; y VP4, que por su sensibilidad a la proteinasa determina la especificidad de tipo P. Se hace referencia a serotipos cuando se identifica el antígeno VP7 y VP4 por análisis de neutralización y a genotipos cuando se realiza la caracterización de los genes codificantes de VP4 y VP7 por técnicas de biología molecular. En la actualidad se han descrito 15 tipos G y al menos 26 tipos P (Figura 1-2)



**Figura 1-2. Clasificación del rotavirus.** Clasificación según las proteínas de la cápside: principales combinaciones en patología humana (Tomado de Román, 2005).

### **1.1.1 PATOGÉNESIS**

El rotavirus infecta a los enterocitos maduros y causa diarrea por varios mecanismos. En primer lugar, el virus está asociado con la muerte celular y con el posterior desprendimiento de la vellosidad del epitelio y la proliferación de las células secretoras de las criptas, resultando en la disminución de la capacidad de absorción del intestino, lo que lleva a la pérdida de líquidos y electrolitos en el lumen. La disfunción epitelial también conduce a la reducción de la expresión de ciertas enzimas digestivas como la sacarosa y la isomaltosa. Asimismo, la atracción osmótica de azúcares acumulados en el intestino delgado agrava aún más la pérdida de líquidos (Widdowson *et al.*, 2005).

Además, la proteína no estructural (NSP4) actúa como una enterotoxina (Ball *et al.*, 1996) que induce a un desequilibrio de calcio intracelular, lo que resulta en la inestabilidad de la membrana citoplasmática de los enterocitos y la pérdida de agua. Al parecer, el mismo efecto lo causa NSP4 cuando interactúa con las células no infectadas por acción de la fosfolipasa de membrana mediada por la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (Gonzalez-Ochoa *et al.*, 2013).

### **1.1.2. PROTEÍNAS ESTRUCTURALES**

En la cápside externa se encuentran dos proteínas estructurales que son la VP7 (37kd) y la VP4 (66kd). La VP7 es la que determina a los serotipos llamados serotipos G, es una proteína glucosilada que induce la formación de anticuerpos neutralizantes. La VP4 es una proteína estructural de la capa externa que se encuentra en menor cantidad que la VP7. Por medio de un corte proteolítico, VP4 se fracciona en VP5 (60kd) y VP8 (28kd). El resultado de este corte es un aumento en la infectividad viral y la inducción de la formación de anticuerpos neutralizantes, como lo hace la VP7.

En la cápside interna se encuentra la proteína estructural VP6 (38kd), que es la más abundante; esta proteína tiene un papel muy importante en la estructura de la partícula viral, ya que mantiene la conformación del virión. Es la proteína que más frecuentemente se utiliza para el diagnóstico de rotavirus por poseer un determinante antigénico común presente en todos los rotavirus del grupo A.

Más internamente se encuentran las proteínas estructurales VP3 (98kd), VP2 (102kd) y la VP1 (125kd). La proteína VP1 presenta cierto grado de homología con algunas enzimas como las ARN polimerasas virales por lo que se supone que la VP1 puede ser la ARN polimerasa. La VP2 tiene como función reclutar al ARN de doble cadena para el ensamblaje viral, por lo que juega un papel importante en la morfogénesis viral (Marylin, 1993). Cuando esta proteína se expresa por si sola con el sistema de baculovirus se ensambla en partículas similares a las nucleocápsides, lo que sugiere que VP2 no depende de otros productos virales (ARN o proteínas) para formar este tipo de partículas (Labbe *et al.*,1991). Se ha demostrado que la VP3 funciona como una guanidiltransferasa actividad atribuida por las siguientes observaciones: a) Tiene una alta afinidad por ARN de cadena sencilla y no se une al ARN de doble cadena (Patton y Chen, 1999); b) su secuencia contiene motivos estructurales que se han encontrado en otras guanidil transferasas (Fukuhara *et al.*,1989; Mitchell & Both, 1990; c) une GTP de modo covalente en una reacción reversible. Dado que esta actividad es necesaria para la síntesis de los ARNs maduros, pero no para los ARNdc, VP3 debe de ser un componente esencial de los complejos de transcripción y no de los complejos replicativos.

### **1.1.3. PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES**

Las proteínas no estructurales juegan papeles cruciales en la modificación selectiva y direccionamiento de procesos celulares esenciales para la síntesis de proteínas y la replicación viral que conducen a la patogénesis.

NSP1, es codificada por el segmento 5 del genoma viral, es la proteína menos conservada del genoma rotaviral y contiene cisteína- histidina con dominios ricos en zinc (Hua y Patton, 1994). Se ha demostrado recientemente que muestra función de ligasa E3 de ubiquitina, permitiéndole mediar la supresión de la respuesta inmune innata, usando mecanismos entre los que se encuentra la degradación en el proteasoma de los factores reguladores de la transcripción IRF3, IRF5 e IRF7 y la inhibición de la activación de NF-  $\kappa$  B al evitar la degradación del inhibidor de  $\kappa$  B( $\text{I}\kappa\text{B}$ ) (Barro y Patton, 2007; Graff *et al.*, 2007).

NSP2 de 35-kDa es un componente importante en el complejo replicativo del virus (Gallegos y Patton, 1989) y junto con NSP5 forman la estructura del viroplasma que son

sitios de la replicación, empaquetamiento y ensamblaje del ARN viral (Hu *et al.*, 2012). Los estudios bioquímicos sobre NSP2 recombinante han demostrado que forma fácilmente octámeros y tiene actividad NTPasa (nucleosido trifosfatasa). Se une al ARN de cadena simple y tiene actividad desestabilizadora de hélice. Basado en estas propiedades, se ha sugerido que NSP2 puede funcionar como un motor molecular que usa la energía derivada de la hidrólisis de NTP para facilitar el empaquetamiento del genoma viral. (Taraporewala *et al.*, 1999; Taraporewala *et al.*, 2001).

NSP3 es un homólogo funcional de la proteína de unión a la cola de poli (A) (PABP) presente en las células por lo cual está implicada en el reconocimiento específico de los ARNm rotavirales y en facilitar su traducción utilizando la maquinaria celular (Piron *et al.*, 1998). A semejanza de las PABP celulares, el dominio N-terminal de NSP3 interactúa con la secuencia consenso del extremo 3' del ARNm viral de rotavirus y el dominio C-terminal interactúa con eIF4G para permitir la circularización de ARNm viral y su entrada a los ribosomas para la síntesis de las proteínas virales.

NSP4 es codificada por el segmento 10 del genoma, es una proteína multifuncional de 175 aminoácidos, y es esencial para la morfogénesis y patogénesis viral (Bergmann *et al.*, 1989). La NSP4 es una proteína glicosilada residente del retículo endoplasmático (RE), con un dominio transmembranal, el cual permite que 132 residuos carboxilo terminales estén orientados hacia el citoplasma. Este dominio citoplásmico 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 RE (Au *et al.*, 1989), Nsp4 es la primera enterotoxina identificada y codificada por el virus que se une en la membrana de la célula a un receptor aún no identificado, produciendo incremento de calcio intracitoplasmático, activación de AMPc y aumento en la secreción de cloruro y diarrea secretoria (Ball *et al.*, 1996).

NSP5, el principal producto codificado por el segmento 11, es un polipéptido de 20 kDa que sufre glicosilación y fosforilación produciendo isoformas que varían de tamaño desde 26 hasta 37 kDa (Afrikanova *et al.*; 1996; Gonzalez, 1991; Blackhall *et al.*, 1998; Poncet *et al.*, 1997). Es una proteína rica en serina-treonina que contiene sitios de unión a múltiples quinasas celulares. Sin embargo, las quinasas celulares que se requieren para su

fosforilación aún no se han identificado. NSP5 parece experimentar la hiperfosforilación y desfosforilación, y las formas hiperfosforilada se encuentran en la fracción insoluble del viroplasma. Su fosforilación esta modulada por la interacción con otra proteína no estructural, la NSP2 (Sen *et al.*,2006; Afrikanova *et al.*,1998). También posee actividad ATPasa.<sup>32</sup> NSP5 interactúa conNSP2, estas dos proteínas son los componentes principales de las estructuras del viroplasma en la célula infectada. También interactúa con NSP6 (Torres-Vega *et al.*, 2000), la ARN polimerasa dependiente de ARN VP1 (Arnoldi *et al.*, 2007) y con la proteína VP2 en el interior de la cápside (Berois *et al.*, 2003). Esto indica que NSP5 tiene un papel esencial en la replicación y empaquetamiento del rotavirus. (Campagna *et al.*,2005; Lopez *et al.*, 2005).

#### **1.1.4. ENTRADA DEL ROTAVIRUS A LA CÉLULA**

La entrada de los rotavirus a la célula huésped es un complejo proceso que incluye varias interacciones de las proteínas de la capa externa del virus con diferentes moléculas de la superficie celular. Los receptores celulares son importantes para determinar el tropismo viral y la patogénesis. *In vivo*, los rotavirus presentan un tropismo por los enterocitos maduros de las vellosidades del intestino delgado, lo que sugiere que estas células contienen receptores específicos para el virus (Kapikian *et al.*, 2001). *In vitro*, el rotavirus se unen a una amplia variedad de líneas celulares, sin embargo, sólo algunos de éstos, incluida las líneas celulares de origen renal o intestinal (Estes yCohen, 1989) y algunas líneas transformadas de cáncer de mama, estómago, hueso o de origen pulmonar, son eficientemente infectadas (Ciarlet *et al.*, 2002). Esta observación sugiere que la unión inicial del rotavirus a la superficie celular es promiscuo, y que la interacción posterior con receptores post-adhesión son los responsable de la entrada del virus en la célula.

Se considera que los rotavirus utilizan como receptor funcional un complejo de varias moléculas que incluyen, entre otras, el ácido siálico, las integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha\beta2$ , la proteína de choque térmico Hsc70 y la proteína disulfuro isomerasa, PDI (Lopez y Arias, 2006; Lopez y Arias, 2004). Se ha demostrado que la unión de algunos rotavirus de origen animal es dependiente de la presencia de ácido siálico en la superficie celular y que esta interacción es necesaria para que exista una infección eficiente tanto *in vivo* como *in vitro*. (Ciarlet y Estes, 1999). La unión de los rotavirus al ácido siálico tiene lugar a través de los aminoácidos 93 a 208 de VP8\* (Arias *et al.*, 2001). Las integrinas han sido implicadas en

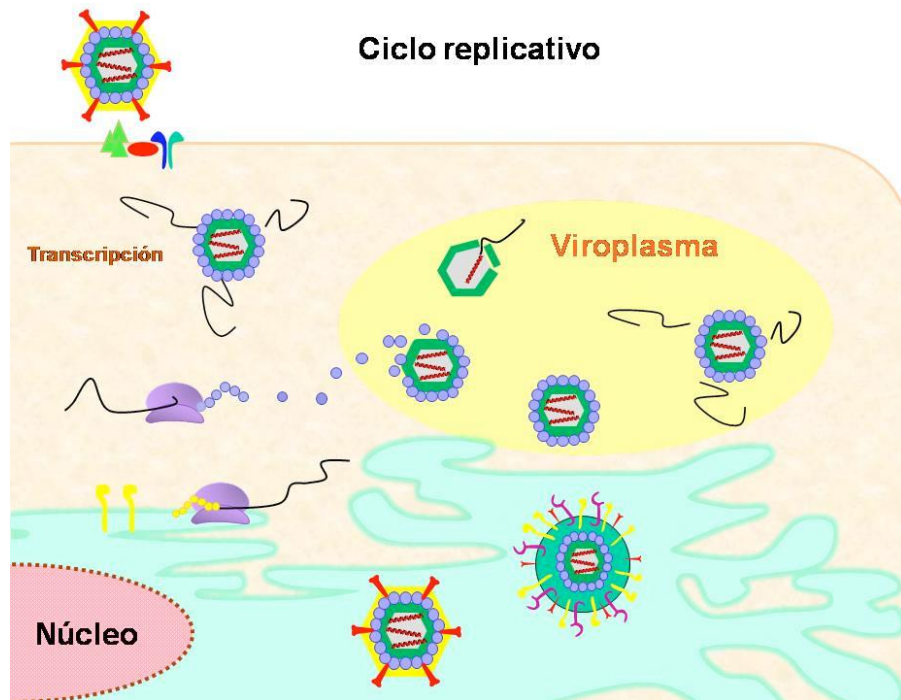
los eventos de unión, post-unión y entrada de rotavirus durante el proceso de infección, estas tiene la capacidad de reconocer secuencias en la proteínas virales, tal es el caso de la integrina  $\alpha 2\beta 1$  que se une a la secuencia DGE en la posición 308-310 de la proteína VP4 (VP5\*), mientras que la integrina  $\alpha 4\beta 1$  encuentra un sitio potencial de unión en la secuencia IDA (aa 538- 540) de esta misma proteína viral. Sin embargo, la integrina  $\alpha 2\beta 1$  en sí misma no es responsable de la unión inicial a la célula en el caso de los rotavirus dependientes de ácido siálico. Es así como la cepa rotaviral nar3, una mutante independiente de ácido siálico, se une a la célula a través de  $\alpha 2\beta 1$ , mientras que la cepa RRV se une a esta integrina en un evento posterior a su unión al ácido siálico. (Zárate *et al.*,2000; Méndez *et al.*,1997). Las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  también se han reportado como mediadores de la unión y la infectividad de algunos rotavirus, siendo VP4 (VP5\*) responsable de la unión a  $\alpha 4\beta 1$  a través de la secuencia YGL (Graham *et al.*, 2005), y VP7 a través de las secuencias potenciales LDV o LDI (Coulson *et al.*, 1997).

Algunas proteínas de la familia PDI no se encuentran confinadas al RE, sino que es posible encontrarlas en el espacio extracelular, el citosol, el núcleo y en la superficie celular. En varios tipos de células se ha encontrado que la proteína disulfuro-isomerasa de la superficie celular es reductora, mientras que la proteína intracelular es oxidante (Turano *et al.*, 2002; Jordan y Gibbins, 2006; Gallina *et al.*, 2002). Las PDI de la superficie celular reduce los enlaces disulfuro facilitando la entrada del virus de la inmunodeficiencia (HIV) a las células linfoides (Markovic *et al.*, 2004), en rotavirus utilizando reactivos que alteran la actividad oxido-reductora de la membrana citoplasmática como DTNB, bacitracina y N-acetil cisteína (NAC) o preincubando las células con anticuerpos anti-PDI se disminuye la infectividad sugiriendo que la actividad de la proteína disulfuro-isomerasa es importante para los eventos tempranos de entrada del rotavirus a la célula (Calderon *et al.*, 2012; Rivera, 2004; Santana, 2008)

#### **1.1.5. CICLO REPLICATIVO DEL ROTAVIRUS**

Los rotavirus inician su ciclo de infección uniéndose a un receptor localizado en la superficie de la célula. Después de la unión al receptor, los rotavirus penetran al interior de la célula y pierden la capa externa VP4 y VP7, convirtiendo de este modo a las TLP en partículas de doble capa (DLP), con lo cual se activa la transcripción. Los ARNs recién sintetizados cumplen dos funciones: como ARNs mensajeros que dirigen la traducción de

las proteínas del virus, y como molde para la síntesis de los ARNs complementarios para la replicación del genoma. La selección, el empaquetamiento, y la replicación de los segmentos del genoma, así como la morfogénesis de las partículas de doble capa (DLPs), se llevan a cabo en estructuras electrodenudas denominadas viroplasma, que están compuestas de grandes cantidades de ARN y proteínas virales. Una vez formadas, las DLPs abandonan el viroplasma, y adquieren la capa externa al gemar a través de la membrana del retículo endoplásmico modificada por proteínas virales, finalmente los viriones maduros son liberados de la célula por lisis (Figura 1-3). Todo el ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular, sin necesitar el núcleo de la célula (López y Arias, 2011).



**Figura 1-3. Ciclo replicativo del rotavirus.** El virus interactúa con sus receptores en la superficie de la célula y penetra por un mecanismo aún desconocido. En el interior de la célula se activa la transcriptasa viral y los ARNs dirigen la síntesis de proteínas virales. Las proteínas se acumulan en estructuras llamadas viroplasma donde se replica el ARN viral y se ensamblan las partículas de dos capas (DLPs) para proseguir la morfogénesis en el retículo endoplásmico (Tomado de Rojas *et al.*, 2008).

## 1.2. ROL DEL ÁCIDO SIÁLICO EN LA INFECCIÓN DE ROTAVIRUS

Los ácidos siálicos (AS) comprenden una familia de monosacáridos de más de 50 miembros derivados del ácido neuramínico (un azúcar de nueve carbonos). La presencia del grupo carboxilo en el carbono 1 y del grupo amino en el carbono 5, le confieren una carga neta negativa a pH fisiológico (pK 2,2). Los ácidos siálicos se localizan en posición terminal o lateral de los oligosacáridos en glicoproteínas y glicolípidos. Debido a su posición terminal y a sus características fisicoquímicas, los ácidos siálicos participan en fenómenos de atracción y repulsión de cargas entre moléculas, desempeñan funciones como moduladores en el transporte de moléculas cargadas positivamente y participan en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Traving y Schauer, 1998). Los ácidos siálicos pueden estar unidos en enlace  $\alpha$ -2,3 ó  $\alpha$ -2,6 a residuos de galactosa (Gal), en enlace  $\alpha$ -2,6 a residuos de N-acetil galactosamina (GalNAc) y en enlace  $\alpha$ -2,8 a otro residuo de ácido siálico. Los diferentes tipos de enlace que forman, así como, la variabilidad que existe en la familia da como resultado una gran diversidad de estructuras derivadas del ácido siálico (Harduin *et al.*, 2001). Los ácidos siálicos tienen en su estructura un anillo piranósico constituido por cinco carbonos y un oxígeno formado por un hemiacetal en conformación en silla. Los ácidos siálicos más abundantes en la naturaleza son el ácido N-acetilneuramínico, ( $C_{11}H_{19}NO_9$ ) abreviado habitualmente como Neu5Ac, NeuNAc, NeuAc o NANA y el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) que difieren en el radical que se encuentra unido al carbono de la posición 5. Neu5Ac se encuentra en todas las especies animales; Neu5Gc en algunas, pero no en los tejidos sanos de humanos. Existen otros ácidos siálicos generados por modificaciones de los grupos hidroxilo de las posiciones C4, C7, C8 y C9 por acetato, lactato, sulfato, ésteres fosfato o metil ésteres, además de las cuales existen lactonizaciones ínter o intramoleculares en las que están involucradas las posiciones C1 y C5 con lo que se amplía la variedad de estos compuestos (Figura 1-4) (Rosenberg 1995; Malykh *et al.*, 2001).

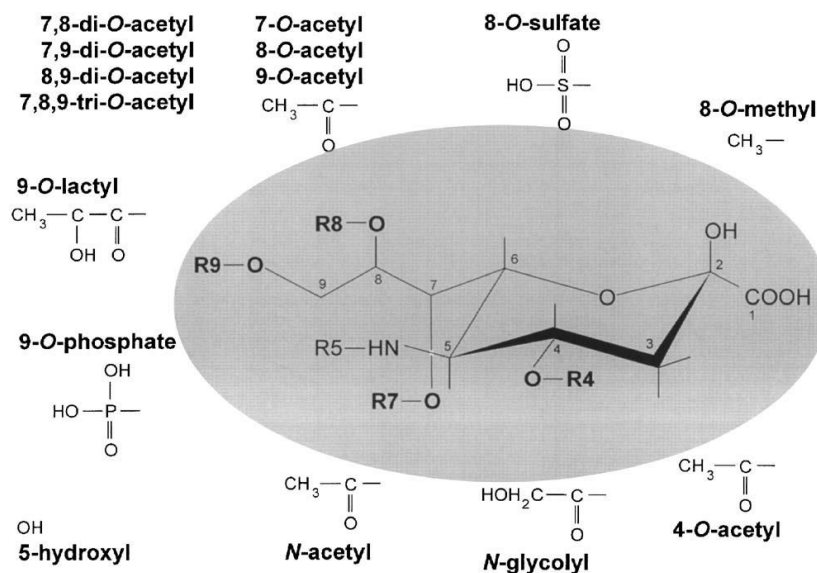


Figura 1-4. Familia de ácidos siálicos presentes en la naturaleza (Tomado de Schauer, 2004)

La actividad hemaglutinante de algunas cepas de rotavirus llevo a la idea de que el ácido siálico está involucrado en la interacción del virus con la superficie de la célula y, de hecho, se encontró que la unión celular y la infectividad de algunas cepas de rotavirus animales requieren la presencia de ácido siálico en la superficie celular. El tratamiento de las células con neuraminidasa (NA) (una enzima que escinde los ácidos siálico terminales de los glicoconjugados) redujo la infección de aquellos virus con actividad hemaglutinante. La capacidad de diferentes cepas de rotavirus para infectar células tratadas con NA, y su actividad hemaglutinante, se resumen en la Tabla 1-1.

Tabla 1-1. Resumen de la actividad hemaglutinante de las cepas rotavirales

Cepa viral	Origen	G	P	HA	NA
		Serotipo	Serotipo <sup>a</sup>		
NCDVC486RF, BRV033	Bovino	6	6[1]	+	+
SA	Simio	3	5B[2]	+	+
HCR3	Humano	3	5A[3]	NT	+
Ro1845	Humano	3	5A[3]	+	NT

Tabla 1-1 (continuación)

<b>Cepa viral</b>	<b>Origen</b>	<b>G</b> <b>Serotipo</b>	<b>P</b> <b>Serotipo<sup>a</sup></b>	<b>HA</b>	<b>NA</b>
RRV	Simio	3	5A[3]	+	+
C U-1, K9	Canino	3	5A[3]	+	+
FRV64	Felino	3	5A[3]	+	+
Cal97	Felino	3	5A[3]	+	+
GRV	Caprino	3	[3]	+	NT
DS-1, S2, KUN	Humano	2	1B[4]	-	-
L26	Humano	12	1B[4]	NT	-
UK,WC3, B-641	Bovino	6	7[5]	-	-
678	Bovino	8	7[5]	NT	-
McN13	Humano	2	2A[6]	NT	-
ST3	Humano	4	2A[6]	NT	-
Gottfried	Porcino	4	2B[6]	+	-
C95	Porcino	1	9[7]	NT	+
CRWS,A131,A138,A411	porcino	3	9[7]	NT	+
OSU,C134,TFR-41,EE	porcino	5	9[7]	+	+
H1	equino	5	9[7]	+	+
YM, A253	Porcino	11	9[7]	+	+
Wa,KU,D,M37,1076	humano	1	1A[8]	-	-
MO,YO, Ito,Nemoto	humano	3	1A[8]	-	-
VA70,Hochi, Hosokawa	humano	4	1A[8]	NT	-
W161	humano	9	1A[8]	NT	-

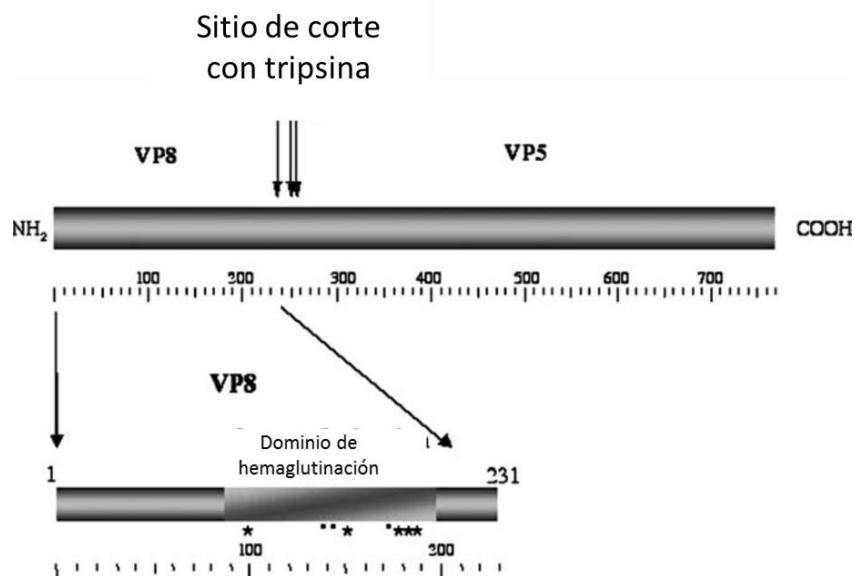
Tabla 1-1 (continuación)

Cepa viral	Origen	G Serotipo	P Serotipo <sup>a</sup>	HA	NA
K8	humano	1	3[9]	NT <sup>b</sup>	-
O264, AU-1	humano	3	3[9]	-	-
Cat2	felino	3	3[9]	-	-
69M	humano	8	4[10]	NT	-
B223	bovino	10	8[11]	NT	-
I321	humano	10	8[11]	NT	-
H2,FI14	equino	3	4[12]	-	-
FI-23,FR5	equino	14	4[12]	NT	-
A46	porcino	5	4[12]	NT	-
Ala,C-11,BAP-2,R-2	conejo	3	11[14]	-	-
PA169	humano	6	11[14]	NT	-
HAL1166	humano	8	1[14]	NT	-
Mc35	humano	10	11[14]	NT	-
Lp14	ovino	10	[15]	NT	-
EDIM,EW,EC,EB	murino	3	10[16]	-	+/- <sup>c</sup>
Ch-1	pollo	7	[17]	NT	+
TY-1,TY-3	pavo	7	[17]	NT	+
PO-13	paloma	7	[17]	NT	+
L338	equino	13	12[18]	+	+/-
4F	porcino	3	[19]	NT	-

Cepas rotavirales con actividad hemaglutinante (HA) y cepas sensibles a la neuraminidasa (NA). a serotipo *P en [ ]* el genotipo cuando se conoce. b NT no evaluado. c inhibición parcial de la infectividad. (Traducida de Isa, 2006)

Se observó que la capacidad de aglutinar eritrocitos, de algunas cepas rotavirales, estaba mediada por la interacción de la proteína VP4 con el ácido siálico (AS) presente en la superficie de los eritrocitos. Esta proteína es esencial en el ciclo de vida del virus, ya que permite la unión al receptor y la penetración a la célula. La infectividad de los rotavirus se incrementa, y muy probablemente depende, del tratamiento del virus con tripsina. Este tratamiento proteolítico resulta en el rompimiento específico de VP4 (776 aa) en dos polipéptidos de menor peso molecular, llamados VP8 (aa 1-131) y VP5 (aa 247 a 776) (figura 1-5). La proteína VP5\* tiene la capacidad de unirse específicamente a la superficie de las células, esta interacción se da con la integrina  $\alpha 2b1$ . La proteína VP8 \* media la unión a los ácidos siálicos de la célula huésped (Haselhorst *et al.*, 2008; Arias *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 1985; Zárate *et al.*, 2000).

### PROTEÍNA ROTAVIRAL VP4



**Figura 1-5. Características estructurales de la Proteína VP8.** La proteína VP4 de la cepa de rotavirus RRV tiene 776 aminoácidos de largo, es clivada por tripsina en las argininas 231, 241, y 247, produciendo dos productos finales, VP8 (aminoácidos 1-231) y VP5 (aminoácidos 248-776). El sitio de corte de la tripsina está representado por flechas. Se muestra el dominio de hemaglutinación (aminoácidos 93-208). Los aminoácidos críticos en la unión de los ácidos siálicos están marcados con

asteriscos (aminoácidos 101, 155, y 188 a 190). Los aminoácidos 144, 146 y 187, que también hacen contactos con ácido siálico, están marcados por puntos. (Tomado de Isa 2006)

Las cepas de rotavirus capaces de aglutinar los glóbulos rojos fueron inicialmente llamadas AS-dependientes; sin embargo, se reconoció que el término apropiado era NA-sensible, ya que hay restos de ácido siálico en las estructuras de los oligosacáridos, como los presentes en los gangliósidos, que son menos sensible o no sensible al tratamiento con neuraminidasa (Guo *et al.*, 1999), y que podrían desempeñar un papel en la adhesión celular del rotavirus. Inicialmente se consideró que solamente algunas de las cepas de rotavirus animales eran NA-sensibles, posteriormente se demostró que la infectividad de algunas cepas de origen animal, así como la mayoría de las cepas rotavirales humanas, no se veía afectada por el tratamiento de las células con NA, por lo que fueron clasificadas como NA-resistente (Ciarlet y Estes, 1999; Ciarlet *et al.*, 2002; Fauvel *et al.*, 1978).

El estudio de la estructura cristalográfica de VP8\* de la cepa hemaglutinante RRV en presencia de ácido neuramínico 2 - O-metil -  $\alpha$  - DN – acetil, permitió identificar el dominio de VP8\* responsable de la interacción con el ácido siálico, el cual presenta un pliegue tipo  $\beta$  sándwich de galectina, una familia de proteínas de unión a azúcares. El sitio de unión del AS se ubica en una ranura poco profunda ubicada entre dos hojas  $\beta$ , el borde de la ranura está formado por tirosina 188 y serina 190, en el borde opuesto se encuentra la tirosina 155. El piso de la ranura está formado por arginina 101, valina 144, lisina 187 y tirosina 189. Los aminoácidos arginina 101, tirosina 189, serina 190 están altamente conservados en las cepas rotavirales hemaglutinantes; tirosina 155 y 118 aceptan cambios a histidina. En las cepas no hemaglutinantes esta secuencia de aminoácidos es más variable (Tabla 1-2) (Isa *et al.*, 1997).

**Tabla 1-2 Secuencia de la alineación de las regiones VP4 que contienen los aminoácidos implicados en la unión a ácidos siálicos**

Cepa Rotaviral	Fenotipo	101 ↓	144 ↓	155 ↓	188 190 ↓↓↓
RRV	HA +	...NNTDRWLAT...	...FIDVVKSTQNGSYSQYGPLQSTPKL...	...ETPNVTTK--YYSTTNYDSVN...	
SA11	HA +	...NNTDRWLAT...	...FIDVVKTTANGSIGQYGSLLSSPKL...	...QTPNARTG--HYSTTNYDSVN...	
OSU	HA +	...NNTDRWLAT...	...FIDVSTTTPTGSYTQHGPLFSTPKL...	...TTPNATTG--YYSATNYDTVN...	
YM	HA +	...NNTDRWLAT...	...FIDVSKTTLTGNYTQHGPLFSTPKL...	...TTPNATTG--YYSTTNYDTVN...	
H1	HA +	...NNTDRWLAT...	...FIDVAKTTLTGNYTQHGPLFSTPKL...	...TTPNATTG--YYSTTNYDTVN...	
L338	HA +	...NNTNRWLAI...	...FIVVSKQTLDGAYAQYGPLLSATKL...	...ETPNATTA--YYSTTNYDTVN...	
FRV64	HA +	...NNTDRWLAT...	...FVDVSKTTQNGSYSQYGPLLSTPKL...	...QTPNATTG--YYSSTNYDSVN...	
Ro1845	HA +	...NNTDRWLAT...	...FVDVSKTTQNGSYSQYGPLLSTPKL...	...QTPNATTG--YYSATNYDSVN...	
Cat97	HA +	...NNTDRWLAT...	...FVDVSKTTQNGSYSQYGPLLSTPKL...	...QTPNATTG--YYSATNYDSVN...	
K8	HA -	...NTTDRWFAC...	...FILFIKLTPTYGYTQYSTLSTPHKL...	...ATPNASES--YYLTINNDNSN...	
RV5	HA -	...NNDFWTAV...	...FFEMFKGSSQGFNSRRRLTSSNNRL...	...ETPRATTD--SSNTADLNNIS...	
KU	HA -	...NNSDFWTAV...	...FLEMFRGSSQNEFYNNRRLTSDTKL...	...ETPRATTD--SSNTANLNDIS...	
Wa	HA -	...NNSDFWTAV...	...FLEMFRSSSQNEFYNNRRLTSDTRF...	...ETPRATTD--SSSTANLNNIS...	
1076	HA -	...NKTDIWWAL...	...FFEMFRSSVSAEFQHKRRLTSDTKL...	...ETPHATTD--YSSTSNLSEVE...	
UK	HA -	...DNAGRWLSV...	...FVEMVKTAVDGDYAEWGTLTSDTKL...	...ETPNATTK--GYFITNYASAE...	
EW	HA -	...NTVNRWIAL...	...FIDFMKTPTTGSYVRYNILLSSTKL...	...ETPTAGQA--YYSSF--NIFN...	
H2	HA -	...NSINRWLAT...	...FMNLIKTTLSGNFTLYSTLLSEPKL...	...ETPNATTT--GYVTSNYDSL...	
69M	HA -	...NNTNRWLAT...	...FIDLKMTTSSGTYTQHSPLLSEPKL...	...ETPNAITN--GYPTTNYDSVN...	
MDR13	HA -	...NNTSIWLAT...	...FIDFGRSSQNDSTNYGTLTSENKL...	...DTPNAVPEWGYTTNNYDEIV...	
B223	HA -	...DNSTFWMFT...	...FVDYIKTSSTQAYGSRNYLNTAHL...	...ADTQGDLRVGTYSNPVNAV...	

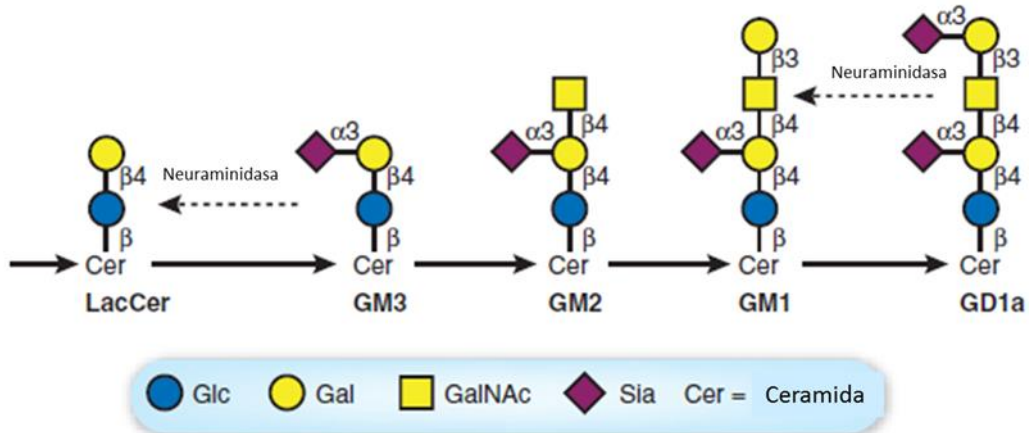
Hemaglutinación positiva (HA +) hemaglutinación negativa (HA-) indican el fenotipo de las cepas rotavirales. Los aminoácidos que pueden estar implicados en la unión al ácido siálico en las cepas hemaglutinantes y no hemaglutinantes, se muestran en negrita (Tomado de Isa 2006).

El análisis de la estructura cristalográfica de VP8 de la cepa CRW-8, permitió identificar una ranura alterna, que tiene la capacidad de interactuar con los hidratos de carbono, ranura conservada en la cepa rotaviral Wa. Se descubrió además que la cepa humana Wa era capaz de unirse al AS ubicado en posición subterminal a través de VP8 (Delorme *et al.*, 2001), esto sustenta la posibilidad de que incluso las cepas de rotavirus NA-resistentes interactúan con el AS. Esta observación es consistente con el hecho de que los ácidos siálicos subterminales son resistentes al tratamiento con NA (Haselhorst *et al.*, 2009).

Estudios que buscaban sitios de unión del rotavirus, sugirieron que los glicoesfingolípidos que presentan uno o más residuos de ácidos siálicos (gangliósidos), son receptores

iniciales de los rotavirus. Los Glicosfingolípidos son una familia grande y heterogénea de lípidos anfipáticos presentes en la matriz extracelular de las membranas plasmáticas de todos los mamíferos. Son lípidos formados por un cerámido unido a una cadena de oligosacáridos de tamaño variable. Los gangliósidos son glicosfingolípidos con uno o más residuos de AS. Los gangliósidos se sintetizan mediante la adición paso a paso de residuos de azúcares a la cerámida. La UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-N-acetilgalactosamina y el CMP-N-acetilneuraminato son los dadores activos de estos residuos de azúcares (Figura1-6). Aunque no está bien comprendido, se sabe que los gangliosidos juegan un papel importante en la adhesión celular, las interacciones célula-célula y la transducción de señales. Además de estas importantes funciones biológicas también se utilizan como receptores para virus de diferentes familias como Polyomaviridae, paramixovirus y el virus de la influenza. (Banda *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2013; Garrido yTeijon, 2006).

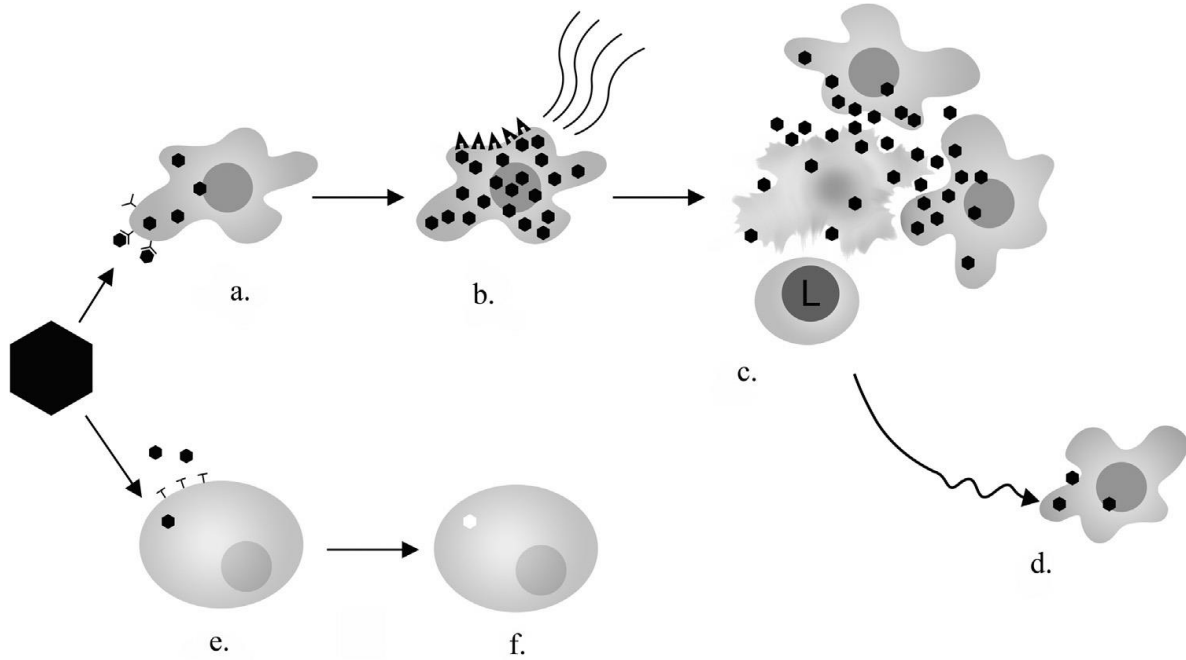
Para comprobar el papel de los glicosfingolípidos en la entrada del rotavirus, se realizaron ensayos de unión con cromatografía en capa fina usando gangliósidos como GM1 y GM3, que permitieron demostrar que las cepas rotavirales NA-sensibles como SA11 y NCDV se unían a gangliósidos que presentaban AS en posición terminal y que la cepa NA-resistente UK reconoce gangliósidos con AS internos (Delorme *et al.*, 2001). Confirmando estas observaciones, se reportó que el gangliosido GM1a, el cual presenta residuos de AS subterminales, es importante para la infectividad de las cepas humanas NA-resistentes KUN y MO (Guo *et al.*,1999); mientras que GM3 (que contiene residuos terminales de AS) bloquean la infección de la cepa rotaviral NA-sensible de origen porcino OSU (Rolsma *et al.*, 1998). Se determinó que el gangliosido GM1a se une a la proteína VP8 de la cepa NA-resistente Wa, mientras que el gangliosido GD1a (que contiene restos de AS terminales y subterminales) se une a la VP8 de la cepa NA-sensible CRW-8. Es de destacar que no hubo unión de GM1a al dominio de VP8 de la cepa CRW-8, ni unión de GD1a a la VP8 de Wa (Guo *et al.*,1999). Por lo tanto, se puede decir que las cepas NA-sensibles se unen a los residuos externos de ácido siálico en los gangliósidos, mientras que las cepas NA-insensible reconocen gangliósidos con ácidos siálicos internos, que son resistentes al tratamiento con neuraminidasas.



**Figura 1-6. Vías de biosíntesis de gangliósidos y acción de la neuraminidasa.** Los Gangliósidos son lípidos polares, con un núcleo de ceramida, unido a cadenas de glicanos neutros que contienen monosacáridos tales como glucosa (Glc), galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (GalNAc), con un número variable de residuos terminales o subterminales de ácido siálico (AS). Las flechas continuas muestran vías para la biosíntesis de estos tipos de gangliósidos. Enzimas sialidasas o neuroaminidasas, por ejemplo, de *V. cholerae* elimina los ácidos siálicos terminales (Tomado de Banda *et al.* 2009).

### 1.3. VIRUS ONCOLÍTICOS

Cáncer es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. (Cancer, 2014). El cáncer es una causa importante de muerte en el mundo. Aunque los tratamientos para la enfermedad han mejorado significativamente, la quimioterapia o radioterapia convencionales todavía tienen efectos limitados contra muchas formas de cáncer, por no mencionar una gran cantidad de efectos secundarios relacionados con el tratamiento (Wong *et al.*, 2010). Esta situación ha dado un impulso a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que pueden destruir selectivamente las células tumorales, dejando las células normales sanas y salvadas (Singh *et al.*, 2012). Los virus oncolíticos (VO) surgen como una alternativa prometedora para el tratamiento del cáncer. El término "virus oncolíticos" se usa generalmente para indicar partículas virales no patógenas que infectan específicamente células cancerosas provocando su muerte, mientras que no afectan los tejidos sanos. (Figura 1-7)



© 2013 Erymine Graphics / Sze

**Figura 1-7. Virus oncolítico.** El virus es representado por hexágonos negros, ataca una célula cancerosa (a). Como resultado del tropismo natural hacia un tipo de célula o un antígeno o receptor celular específico relacionado con el tumor, el virus ingresa a la célula maligna más fácilmente de lo que lo haría en una célula normal (e), la cual puede no exhibir la misma receptividad de infección. Sobre la infectividad de las células malignas, la tolerancia natural de la célula que permite que el material genético maligno se propague también permite la replicación sin control del virus (b). Una infección de una célula normal (f) es evitada como resultado de la habilidad de la célula para reconocer y destruir el material genético anormal. La célula infectada producirá proteínas virales que son antígenos y que pueden alertar al sistema inmune y si el virus está genéticamente armado, la célula puede producir citoquinas y otras señales químicas que activen el sistema inmune. Las células cancerígenas infectadas son lisadas por la infección viral, liberan nuevas partículas virales que infectarán las células malignas vecinas (c). La lisis libera nuevos virus y antígenos relacionados con el tumor, los cuales pueden ser reconocidos y atacados por el sistema inmune, representado aquí por un linfocito (L). La lisis relacionada con la viremia puede resultar en la infección de tejido metastásico (d), transformando un efecto local en un efecto sistémico (Tomado de Sze 2013).

La capacidad de los virus para matar las células del cáncer se ha reconocido desde el siglo diez y nueve, cuando se observaron casos de regresiones tumorales que coincidían con infecciones virales naturales. Sin embargo estas regresiones fueron de corta duración y por lo general solo duraban uno o dos meses. Los primeros ensayos clínicos realizados consistían en administrar fluidos corporales que presentaran partículas virales a otros pacientes de cáncer y observar el resultado. Probablemente, el sistema inmune de los pacientes destruía los virus, lo que no permitía que estos destruyeran las células malignas. Con el desarrollo de nuevos modelos y métodos para la replicación viral en los años 1950 y 1960, hubo diversos intentos de desarrollar virus con mayor especificidad por

los tumores, pero muchos investigadores dejaron de trabajar con los virus debido al poco éxito (Kelly y Russell, 2007).

A lo largo de las siguientes tres décadas, la viroterapia oncolítica fue abandonada casi por completo debido a la falta de resultados claros y prometedores en los ensayos clínicos. La posibilidad de utilizar los virus como herramientas antitumorales regresa en la década de los 90, con el establecimiento de tecnologías de ingeniería genética moderna. Es así como en 1991 la supresión del gen de la timidina quinasa UL23 en el herpes simple 1 (HSV-1), permitió desarrollar el primer virus oncolítico de replicación selectiva para su análisis en el laboratorio (Martuza *et al.*;1991). En el año 2005, el adenovirus (Ad) con supresión del gen E1B 55K (H101 (Oncorine); Shanghai Sunway Biotech, Shanghai, China) fue aprobado en China como el primer virus oncolítico del mundo para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, en combinación con la quimioterapia (Garber, 2006). Sin embargo, hasta ahora, el uso generalizado de la viroterapia oncolítica está todavía lejos de la realidad.

Típicamente, los VO se dividen en dos clases: (i) los virus que se replican naturalmente preferentemente en las células cancerosas y no son patógeno en los seres humanos, esta característica se debe a menudo a la elevada sensibilidad a la señalización antiviral innata o dependencia de rutas de señalización oncogénicas. Estos incluyen parvovirus autónomos, virus mixoma (MYXV; poxvirus), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV; paramixovirus), reovirus y el Virus del Valle de Séneca (SVV; picornavirus); y (ii) los virus que son manipulados genéticamente para su uso como vectores de vacuna, incluyendo el virus del sarampión (MV); paramixovirus, poliovirus (PV; picornavirus), y el virus vaccinia (VV; poxvirus), y / o aquellos diseñados genéticamente con mutaciones / deleciones en los genes necesarios para la replicación en células normales pero no en las células cancerosas, incluyendo adenovirus (Ad), virus del herpes simple (HSV), VV, y virus de la estomatitis vesicular (VSV; rabdovirus) (Russell *et al.*,2014; Cattaneo *et al.*,2008).

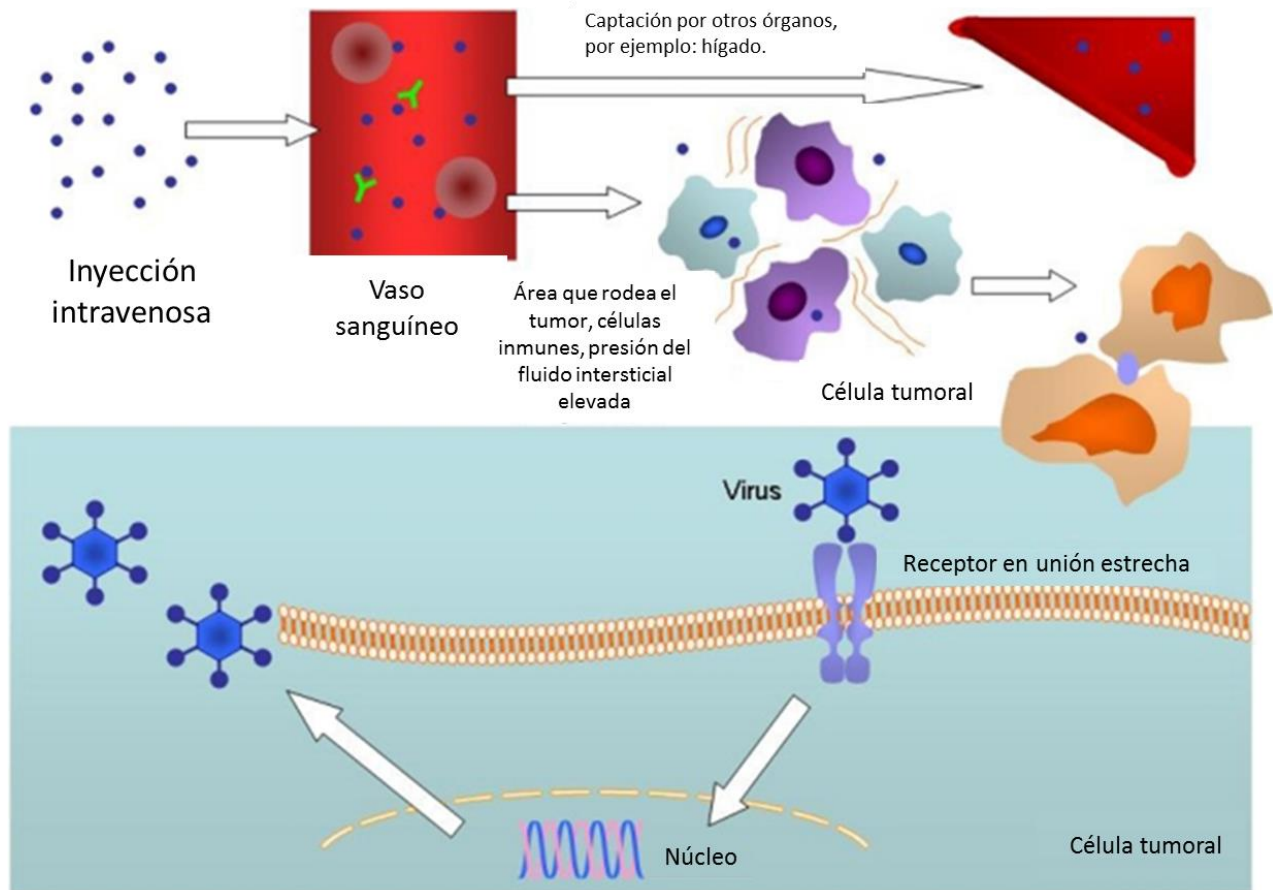
Los virus oncolíticos median la destrucción de las células tumorales a través de diversos mecanismos, uno de ellos es la lisis de la célula, como resultado de la replicación viral. Este ciclo se puede repetir con viriones de la progenie que pueden infectar a las células adyacentes y destruirlas mediante la replicación. Esta replicación proporciona una amplificación continua de la "dosis de entrada", que continúa hasta ser abrogada por una respuesta del sistema inmune o a la falta de células susceptibles. Como segundo mecanismo, ciertos virus oncolíticos generan proteínas durante su ciclo replicativo que

son citotóxicas para las células tumorales. Los adenovirus, por ejemplo, expresan la proteína de la muerte E3 de 11,6 kD y la proteína E4orf4 en el ciclo celular, estas dos proteínas son citotóxicas para las células (Tollefson *et al.*, 1996; Shtrichman y Kleinberger, 1998). Un tercer mecanismo por el cual los virus oncolíticos median la destrucción de las células tumorales es a través de la inducción de la inmunidad antitumoral específica e inespecífica.

La administración intratumoral es el principal método que se ha empleado para la entrega de estos nuevos agentes. Una amplia gama de virus oncolíticos han sido aplicados a través de inyección intratumoral con una medida de éxito en el tratamiento de tumores sólidos, que son fácilmente accesible (Khuri *et al.*, 2000; Hecht *et al.*, 2003). Sin embargo, la muerte por cáncer a menudo es el resultado de tumores que son inaccesibles o por metástasis. En este contexto, los virus oncolíticos entregados intratumoralmente dependen de la replicación viral en el sitio del tumor y la diseminación sistémica. Sin embargo, esto es transitorio y, a menudo ineficiente debido al desarrollo de respuestas inmunes ante la infección viral (Ferguson *et al.*, 2012). La propagación eficaz del virus también se ve afectada por la matriz extracelular, la fibrosis y áreas de necrosis que rodea a las células normales en el lecho tumoral (Wong *et al.*, 2010).

La administración intravenosa sistémica de los virus oncolíticos, es una opción para tratar la metástasis o tumores malignos hematológicos. Sin embargo, una vez inyectado, el virus puede verse obstaculizado por la neutralización de anticuerpos, la captación no específica por otros tejidos tales como el hígado y el bazo, así como un escape del virus desde el compartimiento vascular y la activación del complemento (Figura 1-8) (Wong *et al.*, 2010). Está bien documentado que las proteínas del complemento comprometen la actividad oncolítica de algunos virus como el herpes simple, también se ha descrito la neutralización de la infectividad terapéutica del retrovirus. Los anticuerpos neutralizantes preexistentes o inducidos por la terapia, también comprometen gravemente la eficacia antitumoral sistémica de algunos virus estudiados como adenovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus del herpes simple, virus del sarampión, reovirus, y parvovirus. En el caso de los adenovirus, la adhesión a los eritrocitos humanos parece ser otro factor importante que contribuye a la inactivación. Estudios realizados con adenovirus en modelos murinos, han revelado que la captación hepática es un importante obstáculo para la liberación sistémica, donde la mayoría de los virus son eliminados rápidamente de la circulación por células de Kupffer (macrófagos residentes en el hígado), después de la infusión

intravenosa. La captación de los macrófagos retículoendotelial también es un aspecto limitante de la eficacia terapéutica de otros virus oncolíticos (Power y Bell, 2007).



**Figura 1-8. Obstáculos en la entrega exitosa de los virus oncolíticos a las células tumorales.** Después de la inyección intravenosa, los virus son neutralizados por los anticuerpos pre-existentes y la activación del complemento. Los adenovirus (Ads) también interactúan con los glóbulos rojos. El secuestro por parte de otros órganos y del sistema retículoendotelial es un problema particular, a menudo produce citotoxicidad. Desde el torrente sanguíneo, los virus tienen que pasar a través de la matriz extracelular, mezcla de células (incluyendo células normales e inmunes) y una alta presión de fluido intersticial, antes de alcanzar internalizado, trasladado al núcleo, reproducirse, producir proteínas estructurales y no estructurales, lisar la célula y liberar sus progenies, algunos de estos pasos pueden ser inhibidos por factores tales como la respuesta inmune natural del huésped (Tomado de Wong *et al.* 2010)

Son muy pocos los virus que tiene preferencia natural por la replicación en células tumorales. Razón por la cual el enfoque más popular para generar virus oncolíticos ha sido la adaptación de los componentes de la superficie viral. Las proteínas de superficie virales pueden ser modificadas para expresar ligandos que se unan a receptores expresados preferentemente o exclusivamente en las células tumorales. Algunos virus se

han adaptado en los laboratorio al crecimiento en células cultivadas; por ejemplo el virus del sarampión, virus de las paperas y el virus de la enfermedad de Newcastle (Lech y Russell, 2010), virus de la estomatitis vesicular (Barber, 2004), y reovirus (Thirukkumaran y Morris, 2009). Muchos virus, sin embargo, carecen de medio para la unión selectiva a los epítomos de células tumorales. Para adaptar estos virus a la terapia oncolítica, su tropismo natural necesita ser alterado para permitir la unión a receptores específicos de tumores, un enfoque llamado focalización de transducción. Los virus pueden ser adaptados genéticamente para expresar esas modificaciones reorientarlos hacia las células tumorales. La principal ventaja de esta estrategia es que la especificidad de dirección es inherente al genoma viral y, por lo tanto, se mantendrá en la replicación. Los virus de la progenie son capaces de infectar a las células vecinas que albergan el receptor diana, estableciendo de ese modo una infección en cadena que se mantiene hasta que no hayan más células diana tumorales. Un desafío importante de este enfoque es la disponibilidad de receptores diana adecuados sobre las células tumorales. Idealmente, estos receptores deben ser únicos o altamente sobre- expresados con el fin de proporcionar suficiente especificidad para la infección. Los acontecimientos recientes en el campo de la proteómica ya han reconocido varias proteínas que se sobre-expresan en las células tumorales en comparación con el tejido normal y se espera que muchos sean identificadas. Sin embargo la pregunta sigue siendo, si existen proteínas de la superficie tumoral verdaderamente únicas. Esto señala la necesidad de aumentar la especificidad de los virus oncolíticos de otras maneras (Verheije y Rottier, 2012).

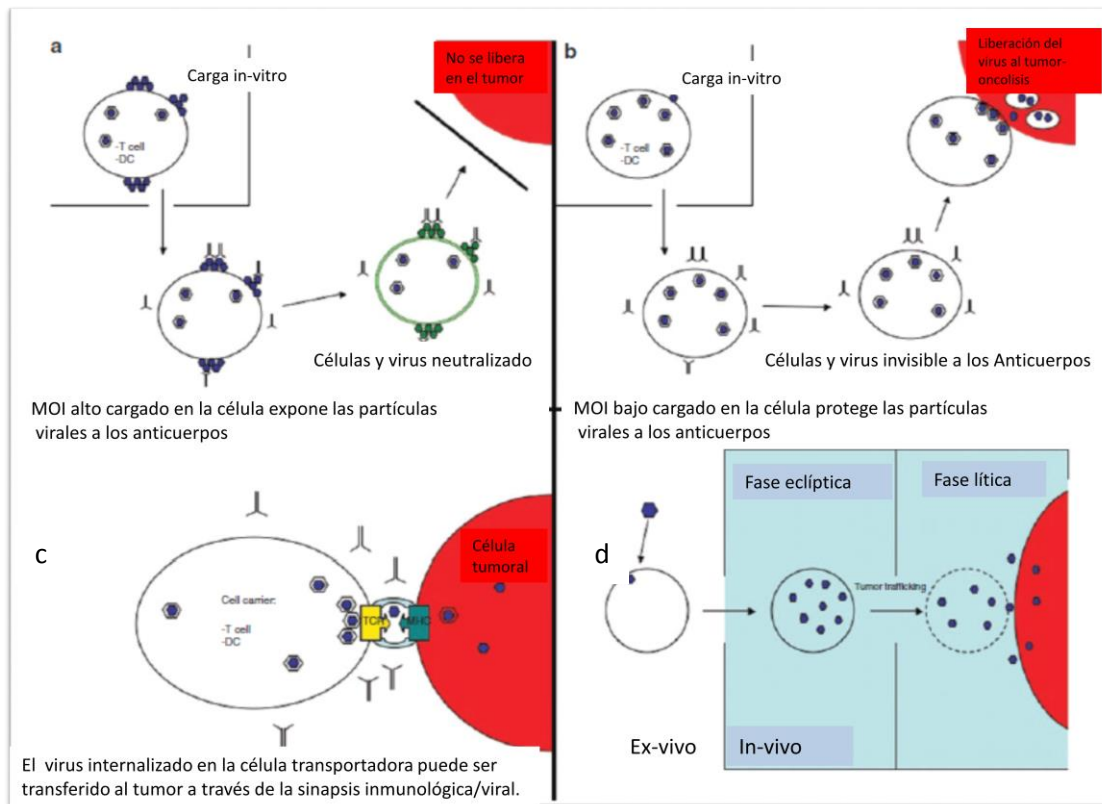
Se han realizado numerosos ensayos clínicos de VO para el cáncer. Como era de esperar, la mayoría es de fase I con unos pocos ensayos de fase II. Actualmente, un ensayo de fase III está investigando el virus oncolítico HSV1 que expresa el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) para el tratamiento del melanoma (Talimogene laherparepvec, T-Vec) patrocinado por Amgen, Inc. Las inyecciones intratumorales del agente T-Vec o GM-CSF solo, fueron asignadas al azar entre los sujetos. Los informes preliminares muestran una tasa de respuesta duradera del 16% para el grupo T-vec en comparación con el 2% para GM-CSF solo, y una tasa de respuesta global del 26% (frente a un 6% para el GM-CSF solo) (Chiocca y Rabkin, 2014).

### 1.3.1 CÉLULAS TRANSPORTADORAS DE VIRUS ONCOLÍTICOS

Para superar algunos de los desafíos que se presentan en la administración sistémica de los virus oncolíticos, varios investigadores están explorando el uso de células como vehículos transportadores (en inglés carrier cells). Este enfoque imita los mecanismos desarrollados evolutivamente por algunos virus como el del virus de la inmunodeficiencia humana que se une a las células dendríticas y macrófagos circulantes, las cuales migran naturalmente a los ganglios linfáticos donde logran transmitir el virus a su población de células diana, es decir los linfocito T CD4 + (Martin, 2009) y de otros virus que se replican a través de la propagación célula a célula, que los hace capaces de eludir la neutralización por los anticuerpos circulantes (Sattentau, 2008). Algunos tipos celulares que se han estudiado como células transportadoras incluyen células tumorales, células endoteliales, células madre mesenquimales y monocitos. Hay varios criterios que deben abordarse al determinar qué tipo de célula debe ser utilizada como portadora para la entrega de un virus oncolítico dado: (i) la susceptibilidad a la infección por el virus oncolítico, (ii) la protección de la carga de la neutralización de anticuerpos, (iii) homing a los sitios de crecimiento del tumor y (iv) la transferencia de la progenie del virus a tejido tumoral (Munguia *et al.*, 2008).

Los virus oncolíticos pueden ser transportados sobre o dentro de las células, de cualquier forma, se requiere la coordinación de tres fases: infección *ex vivo*, transporte y producción viral en el tumor con la cinética del virus. Es fundamental a la vez que el virus no se escape o se libere de golpe, antes de que llegue a su destino, e igualmente importante que se pueda descargar su contenido en el momento y lugar correcto cuando finalmente es entregado.

Las células pueden empaquetar partículas virales infecciosas en su superficie por interacciones específicas y no específicas (Figura 1.9a) También pueden dirigir las partículas virales a compartimentos intracelulares separados de las vías de tráfico convencionales. Así las partículas infecciosas están siendo protegidas de la acción de los anticuerpos neutralizantes, la degradación por proteasas o la inactivación por el complemento, para que posteriormente puedan ser transmitidas a las células tumorales (Figura 1.9b).



**Figura 1.9 Mecanismos por los cuales las células transportadoras empaquetan y protegen los virus oncolíticos.** En la superficie de las células (a). El virus es internalizado, ya sea como parte de la vía de infección productiva o en compartimentos celulares (b). Transmisión de célula a célula a través de la sinapsis virológica (c). La replicación intracelular protege y amplifica el virus permitiendo (d). (Tomado de Willmon *et al.*, 2009)

Se ha demostrado que los virus pasan a las células a través de contacto célula a célula, por mecanismos similares a la sinapsis inmunológica, a los cuales se les ha denominado sinapsis virológica. La sinapsis virológica permite la transmisión del virus sin necesidad de liberar el virus de la células transportadora, protegiendo de esta manera los viriones de peligros asociados a los anticuerpos neutralizantes. (Figura 1.9c)

Alternativamente, las células pueden utilizarse como portadores y amplificadores (Figura 2D). Es decir, si la célula elegida como transportadora es capaz de producir grandes cantidades de virus, debería ser posible entregar más virus en el tumor que el que se cargó in vitro. Es fundamental garantizar la compatibilidad entre la cinética de transporte y la replicación viral dentro de la célula transportadora. Además, al menos las primeras etapas de la replicación viral deben ser "inmune- invisible" para que las células portadoras

no activen los mecanismos de vigilancia inmune prematuramente. Igualmente, las consecuencias de la replicación viral no deben afectar las propiedades naturales de la célula portadora celular. (Willmon *et al.*, 2009)

#### **1.4. ROTAVIRUS COMO VIRUS ONCOLITICO**

Resulta importante seleccionar virus que para infectar utilicen moléculas receptoras ampliamente distribuidas en gran parte de los tumores, por ejemplo, las proteínas de choque térmico, HSPs. Proteínas que han sido descritas como moléculas anti-apoptóticas, presentes en la superficie de muchos tumores y que además son utilizadas como marcadores de progresión tumoral.

Investigaciones realizadas en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, han demostrado que los rotavirus utilizan Hsc70, PDI e integrina  $\alpha\beta 3$  como receptores (Acosta *et al.*, 2009). en líneas celulares susceptibles como MA104 y Caco-2 y enterocitos de ratón. Resultados que han sido corroborados por otros investigadores en el mundo. 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 (Ciocca y Calderwood, 2005; Juhasz *et al.*, 2013; Hamrita *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta que PDI, o las HSPs, incluida Hsc70, no se expresan en la membrana de células del tejido normal y si en neoplasias, esta condición posibilita que el rotavirus pueda ser utilizado en tumores donde estos receptores se expresen. Por ello el director del grupo, Carlos A Guerrero F, ha dirigido estudios para determinar el papel oncolítico del rotavirus. Durante 3 años se seleccionaron en líneas celulares tumorales, 5 aislamientos de rotavirus capaces de utilizar diferentes HSPs durante el proceso infeccioso. Luego se evaluó el potencial oncolítico de éstos aislamientos en diferentes líneas tumorales, como la línea celular de leucemia mieloide humana U937, leucemia linfocítica aguda REH, Cancer de estómago KATO III, cáncer de Pulmón A549, cáncer de mama MCF-7 y MDA, mieloide de ratón Sp2/0-Ag14 y cultivos primarios de leucemias humanas. Como control se utilizaron células normales no tumorales. Se observó la

infección y lisis de las células; los resultados fueron similares para todas las líneas tumorales examinadas, con pequeños cambios.

Varios investigadores del grupo han determinado la expresión de las proteínas Hsp90, 70, 60, 40, Hsc70, integrina  $\alpha V\beta 3$  y PDI en la superficie de la membrana citoplasmática de las células tumorales Sp2/0-Ag14, MCF.7, U937, Kato III y REH por medio de citometría de flujo, inmunofluorescencia o confocal. En estos mismos estudios se adicionaron anticuerpos policlonales dirigidos contra las proteínas celulares Hsp90, Hsp70, Hsc70, integrina  $\alpha V\beta 3$  y PDI antes de la infección viral y se observó una disminución en el porcentaje de células positivas para antígenos virales, lo que sugiere que los aislados rotavirales (WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5 y O-ECwt) en esta línea celular pueden utilizar estas proteínas para favorecer su ingreso a las células tumorales (Silva, 2012; Hernández, 2013)

Igualmente, un investigador del Laboratorio de Biología Molecular de Vrus encontró interacción de los rotavirus con las HSPs de las membranas citoplasmáticas, incubando el rotavirus con las células, con fracciones membranales o con fracciones proteicas enriquecidas con Hsp 90, 70 o 60. La interacción se analizó mediante las técnicas de ELISA de captura o co-inmunoprecipitación. También se encontró cambios en la infección por rotavirus tras inhibir las HSPs, utilizando reactivos reportados como inhibidores de las mismas (Rivera, 2014).

En conclusión, los aislamientos rotavirales obtenidos en este laboratorio infectaron y lisaron las líneas celulares tumorales examinadas, ingresan utilizando las HSPs (Hsp90, Hsp70, Hsc70, Hsp60 o Hsp40), PDI y la integrina  $\alpha V\beta 3$  de membrana citoplasmática, sugiriendo que han adquirido ganancia de función al utilizar proteínas de choque térmico (HSPs). El obtener un rotavirus que utiliza como co-receptores a las HSPs (Hsp90, Hsp70, Hsp60 o Hsp40) es un resultado aun no reportado.

El grupo considera que se han obtenido nuevas cepas que reconocen otras HSPs y dado las HSPs se encuentran como marcadores de progresión tumoral en la mayoría de tumores, estos hallazgos sugieren que estos aislamientos virales pueden ser potenciales virus oncolíticos. Estos resultados son novedosos porque en la literatura no se encuentran antecedentes del uso del rotavirus como virus oncolítico.

## 1.5. GLÓBULOS ROJOS

La membrana de los eritrocitos está compuesta por lípidos (41%), proteínas (52%), y carbohidratos (7%) (84). La bicapa lipídica está compuesta por cantidades similares de colesterol y fosfolípidos distribuidos asimétricamente. En la parte externa de la bicapa predominan la fosfatidilcolina y la esfingomielina mientras que la mayor parte de la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina se localizan en la monocapa interna (An y Mohandas, 2008). La membrana del eritrocito presenta más de 50 proteínas transmembranales cuyos pesos moleculares oscilan entre 15.000 y 250.000. Con relación a su función, las proteínas de membrana pueden ser divididas en 4 grandes grupos: (I) transportadores de membrana, (II) moléculas de adhesión y receptores, (III) enzimas y, (IV) proteínas estructurales del citoesqueleto (Mohandas y Gallagher, 2008; Daniels, 2007). En la membrana citoplasmática, las proteínas se dividen en 2 grupos: a) proteínas integrales de la membrana que incluyen la proteína intercambiadora de aniones (también llamada proteína 1 o banda 3), y las glucoforinas que portan antígenos de superficie glucoproteicos y es abundante en ácido siálico; y b) proteínas periféricas de la membrana citoplasmática, que incluyen proteínas estructurales como espectrinas, ankirinas, actinas y las proteínas 4.1 y 4.2 (Tse y Lux, 1999).

## 2. PLANEACIÓN

### 2.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El proceso de infección viral depende de la entrada del virus a la célula, el cual implica un mecanismo de múltiples pasos; el primero de ellos es la unión del virus a la célula, el cual se basa en la interacción específica entre la proteína del virus y el receptor celular. La unión de los rotavirus a la célula huésped es dependiente de la presencia de ácido siálico (AS) en la superficie celular, y se ha demostrado que esta interacción es necesaria para que exista una infección eficiente tanto *in vivo* como *in vitro* (Ciarlet y Estes, 1999; Méndez *et al.*, 1993).

Se conoce que el tratamiento de las células con neuraminidasa (NA) (enzima que remueve los ácidos siálicos terminales de la superficie celular) disminuye la infectividad de algunas cepas rotavirales. En el caso de algunas cepas de origen animal y de la mayoría de las cepas rotavirales humanas, el tratamiento de las células con NA no tiene este efecto porque existen estructuras de oligosacáridos con AS internos que son menos o no sensibles a la NA (Isa *et al.*, 2006)

Bajo estas condiciones, una rápida unión a sitios con abundante AS (probablemente no específicos) podría detener el desplazamiento del virus para luego unirse a nivel local con los receptores más específicos. La baja afinidad y alta valencia de la interacción entre el rotavirus y el AS, hacen del AS un buen candidato para una unión no-específica, pero esta interacción primaria es potencialmente importante.

Se considera que los rotavirus utilizan como receptor funcional un complejo de varias macromoléculas que incluyen, entre otras moléculas, las integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha\beta2$ , la proteína de choque térmico Hsc70 y la PDI (Guerrero *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2002; Santana *et al.*, 2013; Lopez y Arias, 2004). Se sabe que el rotavirus presenta la capacidad de infectar líneas celulares de cáncer colorectal como Caco 2 (Chaibi *et al.*, 2005) y células HT-29 (Superti *et al.*, 1991). En el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, se han realizado estudios en los cuales se encontró que cepas rotavirales aisladas en el laboratorio infectan y lisan

las líneas celulares Sp40 Ag-14 (mieloma de ratón), U-937 (linfoma histiocítico), REH (leucemia linfocítica aguda), Kato III (carcinoma gástrico), J774 (sarcoma de células reticulares), MDA y MCF-7 (adenocarcinoma de mama), PC3 (adenocarcinoma grado IV de próstata), sugiriendo que las cepas estudiadas son potenciales virus oncolíticos.

Se ha propuesto internacionalmente lineamientos que permiten evaluar un balance entre el potencial oncolítico del virus y los riesgos asociados con el uso del virus candidato a utilizarse. Para esto, es necesario caracterizar el virus oncolítico evaluando la selectividad infecciosa de células tumorales y no tumorales para inferir la seguridad clínica.

De esto deriva la importancia de realizar ensayos para esclarecer si los rotavirus se unen a los glóbulos rojos y si esta unión afecta la capacidad infecciosa a células tumorales o la unión e infección a tejidos sanos en un animal vivo. Por ello se busca determinar si los aislamientos de rotavirus (WTEW, TRUY, WWM, WT1-5, O-Ecwt) se unen a los glóbulos rojos a través de los azúcares y esto induce hemaglutinación o bloquea la infección, impidiendo la infección a células tumorales.

## **2.2. JUSTIFICACIÓN**

Algunos ensayos clínicos han demostrado que los virus oncolíticos se pueden administrar sistémicamente de forma segura y con una baja toxicidad (Ferguson *et al.*, 2012). La administración intravenosa ofrece la oportunidad de tratar el tumor primario y la metastásis simultáneamente. No obstante, algunos estudios muestran que la eficiencia podría estar limitada por la toxicidad sobre los tejidos normales y/o la presencia de una respuesta inmune preexistente en los sujetos tratados.

Sin embargo, cuando entran al torrente sanguíneo, los virus pueden ser atraídos por otras células que no se ven afectadas y que, por el contrario, sirven de protección. Los virus pueden usar las células de la sangre como portadoras a través de la unión con receptores celulares como el AS. Un buen número de rotavirus de origen animal o humano se une a la célula huésped en forma dependiente de AS en la superficie celular. Se ha demostrado que esta interacción es necesaria para que exista una infección eficiente tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los aislamientos de rotavirus que utilizamos en este proyecto se originaron a partir de mezclas de rotavirus conocidas como dependientes del AS (los de origen animal, como RRV, que dieron origen a la variante TRUY) e independientes del AS (los de origen humano, que dieron origen a la variante WWM o WT1-5). Igualmente, se utiliza una variante que se originó de mezclar las variantes TRUY, WWM, WT1-5 y O-Ecwt, denominado WTEW.

Era importante determinar si alguna de estas variantes continuaba siendo dependiente o no de la unión a azúcares y si ésta unión interfiere con la capacidad infecciosa a células tumorales o afecta la unión e infección a tejidos sanos en un animal vivo. De allí, es fundamental saber si los aislamientos de rotavirus (WTEW, TRUY, WWM, WT1-5, O-Ecwt) se unen a los glóbulos rojos a través de azúcares y si esto induce hemaglutinación o bloquea la infección, impidiendo la infección a células tumorales.

Esto es importante en cuanto indica si se pueden o no usar por vía endovenosa o se debe diseñar a futuro estrategias que le permitan al virus circular en sangre sin que sea neutralizado por anticuerpos y sin causar efectos colaterales como hemaglutinación, Para esto se utilizó el modeló glóbulo rojo (con glicoproteínas como glicoforina, rica en AS).

## **2.3. OBJETIVOS**

### **2.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la unión de rotavirus a los glóbulos rojos y el efecto que tiene dicha unión en la capacidad infecciosa en líneas tumorales.

### **2.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- ☀ Determinar la unión de los rotavirus (WTEW, TRUY, WMW, Wt1-5, Ecwt) a los glóbulos rojos.

- ☀ Determinar la infección de rotavirus en diferentes células tumorales, después de incubar los virus con glóbulos rojos.

Determinar la infección del rotavirus Ecwt en tejido normal al aplicarlo vía endovenosa a un ratón.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Líneas celulares

La línea celular Sp2/0-Ag14 (proveniente de mieloma murino) y las células tumorales de mama MCF-7 fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) (Gibco®), suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB) (Gibco®), con 20 U/ml de Penicilina y 40 U/ml de estreptomycin (Invitrogen®), e incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. El cultivo se realizó en cabina de flujo laminar bajo estrictas condiciones de esterilidad. La línea celular REH (ATCC) originada de leucemia linfoblástica humana, fue donada gentilmente por el profesor Jean Paul Vernaut del Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional. Esta línea fue cultivada en medio RPMI-1640, suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB) (Gibco®), en las mismas condiciones descritas.

#### 3.2. Anticuerpos y reactivos

Como reactivos generales se utilizaron los siguientes:

**Tabla 3-1. Reactivos**

Reactivo	Marca	Concentración
Anticuerpos conjugados con Alexa fluor-568	Invitogen®	A11019 2mg/MI
Anticuerpos conjugados con FITC	Santa cruz Biotechnology®	Sc-2024 (200 µl/ml )
Anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina	Vector	AP1000 lote U0912 ( 1:3000)
DAPI	Invitogen®	5 mg/ml
DMEM	Gibco®	
MEM	SIGMA®	Cat No. D5671
SFB	BioWhittaker™	14-502F

Igualmente, se manejaron sueros policlonales anti-rotavirus (1:2000 V:V), generados previamente en conejos en nuestro laboratorio, utilizando como antígeno TLPs.

### **3.3. Cepas rotavirales**

La selección de cepas de rotavirus con capacidad de infectar líneas tumorales responde a dos etapas. La primera etapa involucró la colección de cepas parentales. Un grupo fue donado por el laboratorio del Dr. Carlos Arias de la UNAM, México, correspondientes a: TRF (cerdo), RRV (mono Rhesus), UK (bovino), Ym (cerdo), Wa, Wi, M69 (origen humano), todas adaptadas a la línea celular no tumoral de riñón de mono verde MA104. Un grupo de cepas silvestres fueron aisladas de heces humanas por el Dr. Carlos Guerrero de 5 niños bogotanos y una cepa silvestre que infecta ratones, denominada EDIM-Cambridge (ECwt) fue donada por el Dr. Harry Greenberg de la Universidad de Stanford a través del Dr. Manuel Franco de la Universidad Pontificia Javeriana-Bogotá.

En una segunda etapa, el director del proyecto replicó de manera independiente cada una de las 13 cepas antes mencionadas en líneas celulares tumorales con un promedio de 100 pases replicativos sucesivos. Posteriormente, el mismo investigador mezcló dichas cepas de la siguiente manera: 1. Rotavirus TRF, (cerdo), RRV (mono Rhesus), UK (bovino) y Ym (cerdo) en una mezcla que se le denominó TRUY. 2. Otra mezcla se obtuvo de los rotavirus Wa, Wi y 69M, a la que se le denominó WWM. 3. Los rotavirus silvestres de origen humano aislados de heces, se les denominó Wt1-5. 4. La cepa silvestre que infecta ratones denominada ECwt, se replicó sola en las mismas condiciones. Nuevamente, las mezclas TRUY, WWM y Wt1-5 se replicaron durante 100 pases sucesivos en las mismas células tumorales. Posteriormente, se unieron todas las mezclas de los rotavirus antes mencionados (TRUY, WWM, WT1-5 y O-ECwt) y la mezcla total se replicó nuevamente durante 100 pases en las mismas condiciones y en las mismas células obteniéndose así una mezcla denominada WTEW (mezcla de Wt1-5, TRUY, O-ECwt, WWM). El proceso total de replicación y selección de las cinco cepas duró alrededor de tres años.

### **3.4. Purificación de TLP.**

El lisado viral cosechado en líneas tumorales fue ultracentrifugado a 101500 X g por 1 hora 30 minutos a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 1 ml de buffer TSM (Tris 0.01 M, NaCl 0.15 M, MgCl<sub>2</sub> 0.001M, CaCl<sub>2</sub> 1 M). Luego se adicionó Freón para disociar membranas (1:1/3 vol: vol virus: Freon) y se dio vortex por 5 minutos. La solución fue centrifugada a 13000 X g por 10 minutos a 4 °C, quedando en la base del tubo el Freón, una fase intermedia de proteínas y en la parte superior el sobrenadante donde se ubica el virus soluble. El sobrenadante fue recolectado y al Freón se le adicionó nuevamente TSM, se dio vórtex y de nuevo fue centrifugado. Este procedimiento se repitió tres veces.

El sobrenadante recolectado fue ultracentrifugado a 101500 X g por 1 hora 30 minutos a 4 °C para sedimentar el virus. El sedimento fue resuspendido en TSM y ultracentrifugado a 217 100 X g por 1 hora a 4 °C en un gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Este gradiente se preparó así: 0.5 ml con densidad 1.4157, un ml con densidad 1.3039, 0.5 ml con densidad 1.2070 y 0.5 ml con sacarosa 30%. La banda correspondiente a las DLPs se observa en la porción del 0.5 ml de CsCl con densidad 1.417 y las TLPs en la porción con densidad 1.3039. La banda de TLP y DLP fue resuspendida cada una en buffer TMS.

### **3.5. Expresión celular de la proteína verde fluorescente**

Se usó la proteína verde fluorescente como un marcador celular, para ello se infectaron células con un vector lentoviral con constructos que codifican para la proteína verde fluorescente ("green fluorescent protein", GFP, conocido comercialmente como "Vivid Colors plenti6.3/v5-Gw/EmGFP expression Control vector", Invitrogen®). Este vector fue donado gentilmente por el profesor Orlando Chaparro de la unidad de fisiología, del departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional de Colombia. El vector comercial de expresión pLenti6.3/V5-GW/EmGFP fue generado por una reacción reversa de recombinación ("LR recombination reaction") entre un vector que contiene la GFP y el vector pLenti6.3/V5-DEST. El vector contiene la GFP bajo el control de un promotor constitutivo. Consiste de un plásmido con elementos virales insertos: virus del Sarcoma de Rous y algunos genes del HIV. El constructo es seguro para su uso y no representa peligro para quienes lo manejan, ni para el medio ambiente.

Para transfectar el vector se utilizaron las líneas tumorales REH y SP2/O-AG14, se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con medio de cultivo sin suero fetal bovino (SFB), se reemplazó con medio Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) (Gibco®) suplementado con 10% (vol/vol) de SFB (Gibco®) más 20 U/ml de penicilina con 40 U/ml de estreptomycin (Invitrogen®) y se agregó el sobrenadante de un cultivo celular que contenía el vector que expresa la GFP, junto con 6 µg/ml de polibrene (Polybrene®, Santa Cruz Biotechnology) en cabina de flujo laminar bajo estrictas condiciones de esterilidad. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.6. Purificación de glóbulos rojos**

Se obtuvo 3 ml de sangre periférica tipo O+, se diluyó en 8 ml de medio de cultivo, luego se separaron los glóbulos rojos (GRs) de las células blancas en un gradiente de densidad. Para esto se colocó cuidadosamente la sangre sobre 3ml de Ficol-hypaque, se centrifugó a 400 X g por 30 minutos a 22 °C, se descartaron plaquetas, glóbulos blancos y suero. Los glóbulos rojos se resuspendieron en medio de cultivo llevando al volumen inicial de la muestra.

### **3.7. Test de hemaglutinación**

Se conoce que algunas cepas de rotavirus hemaglutinan y otras no. La hemaglutinación ocurre por la unión del virus al AS de la glicoproteína del GR denominada glicoforina. Para determinar si los aislamientos rotavirales aglutinan los GR, se separaron los GR como se describió previamente y se tomó una alícuota que se resuspendió en buffer fosfato-salino ("phosphate buffered saline" PBS) con albumina de suero bovino al 0,125 % hasta quedar al 0,5% los GR. Luego se distribuyó 50 µls de GR en una placa de 96 pozos de fondo en U.

Paralelamente, los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5, y O- ECwt se activaron con tripsina (1µg/ml por 20 min a 37°C) y en una placa de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas (1:2) en PBS con albumina de suero bovino al 0,125 % en un volumen total de 50 µls. En la primera dilución de partida se aplicó 25 µls de cada uno de los rotavirus con 900.000 UFF (equivalente a un MOI de 18, titulado en la línea tumoral SP2/O-Ag14) más 25 µls de PBS. Posteriormente, la suspensión de cada pozo que contenía los rotavirus se adicionó a la placa que contenía los 50 µl de glóbulos rojos al

0,5% y se incubó por 30 minutos a 4 °C. Como controles positivos de la hemaglutinación se utilizaron la proteína recombinante VP8 de RRV (10 ng) y los rotavirus RRV, YM, TFR. Como controles negativos de la hemaglutinación se utilizaron los rotavirus Wa, WI61, 69M Y ECwt y los glóbulos rojos sin rotavirus. Los eritrocitos aglutinados quedan en suspensión formando una red, mientras que los no aglutinados sedimentan por gravedad.

### **3.8. Ensayo de unión de los rotavirus a los glóbulos rojos**

Para analizar la unión glóbulos rojos-rotavirus se colocaron aproximadamente sesenta millones (60.000.000) de glóbulos rojos en 100 µl de medio de cultivo, sin suero fetal bovino (SFB) por pozo, en placas de 96 pozos. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5 y O-ECwt se activaron con tripsina (1µg/ml por 20 min a 37°C). Luego se inactivo adicionando 1 µg/ml de inhibidor de tripsina, el rotavirus se adicionó (MOI de 2.25, 4.5, 9 y 18 respectivamente) a los GR y se incubó por 1 h a 37 °C.

Para retirar el virus que no se unió a los GR, estos fueron colectados en tubos de microcentrifuga y se centrifugaron a 400 X g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, posteriormente se añadió al botón de células 1 ml de PBS y se agitó suavemente, se centrifugó nuevamente y se eliminó el sobrenadante. Luego, los GR se fijaron con paraformaldehído al 4 % (vol/vol) durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó una vez con 1ml de PBS y se dejaron en 100 µls de PBS con azida de sodio al 0.02% hasta su uso. Se analizó la unión glóbulo rojo-virus mediante las técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo.

### **3.9. Inmunofluorescencia**

Para determinar si los rotavirus WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5 y O- ECwt se unen a los GR, se tomaron aproximadamente 60.000 células y se pusieron sobre cubreobjetos previamente desengrasados con xilol, se llevaron a 50°C por 2h para deshidatarlas y luego se fijaron con metanol por 5 min a temperatura ambiente. Se adicionó anticuerpo (Ac) policlonal dirigido contra proteínas estructurales del rotavirus generado en nuestro laboratorio (1:2000 vol/vol), se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y se realizaron tres lavados con PBS. Posteriormente se adicionó el Ac secundario anti conejo IgG conjugado con FICT (0.2 µg/ml Santa cruz Biotechnology®) y

se incubó por 20 min en cámara húmeda a temperatura ambiente, en completa oscuridad. Las células se lavaron tres veces con PBS y se evaluó la fluorescencia en un microscopio de fluorescencia (VanGuard). Como controles se usaron glóbulos rojos sin virus, incubados o no con los mismos anticuerpos.

Para el análisis mediante epifluorescencia de los antígenos virales, se tomaron diez fotografías de cada laminilla en un microscopio de fluorescencia (VanGuard). Se contó el número total de células positivas y negativas para las proteínas rotavirales y luego se calculó el porcentaje de unión.

### **3.10. Citometría de flujo**

Para analizar el grado de unión glóbulos rojos-rotavirus mediante citometría de flujo, los GR se purificaron como se describió antes y se colocaron en tubos de microcentrifuga, aproximadamente  $1 \times 10^8$  GRs en 200  $\mu$ l. Paralelamente, los aislamientos rotavirales fueron activados con tripsina (1 $\mu$ g/ml por 20 min a 37°C). Se incubaron los GR con los virus (MOI 1.8) durante 1h a 37 °C. Para retirar el virus que no se unió a los GR se centrifugaron a 400 X g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, posteriormente se fijó con paraformaldehído al 4 % durante 30 min a temperatura ambiente y se lavó tres veces con 1 ml de PBS. Se descartó el sobrenadante, se adicionó el anticuerpo primario anti-rotavirus (1: 2000) y se incubó en PBS por 1 h a 37 °C en constante agitación. Se lavó tres veces con 1ml de PBS. Luego las células fueron incubadas con 0,2  $\mu$ g/ml de anticuerpo secundario anti-conejo IgG-conjugado con FITC (Santa Cruz) por 20 minutos a 37 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS y se dejaron en un volumen final de 300  $\mu$ l. Como control se utilizó un anticuerpo isotipo no relacionado, GR sin anticuerpo y GR con el Ac secundario. La fluorescencia fue medida en un BD FACSCanto II y los datos fueron analizados con el programa del equipo.

### **3.11. Infección de líneas tumorales con rotavirus unido a glóbulos rojos**

La unión del rotavirus a los GR ocurre porque esta célula posee en su membrana proteínas ricas en azúcares como la glicoforina que posee abundante AS. Para determinar si dicha unión afecta negativamente o no la infección a las células tumorales, se purificaron los glóbulos rojos como se describió anteriormente, se les adicionó los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5 y O- ECwt, cada uno con un MOI de

0.22, 0.45, 0.9 y 1.8 por 1 h a 37 °C. Al cabo de este tiempo, los eritrocitos se cosecharon y se centrifugaron a 400 X g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y con el objetivo de retirar el virus que no se unió a los eritrocitos, el pellet fue lavado dos veces con medio de cultivo sin SFB.

Los glóbulos rojos-virus se adicionaron a las líneas celulares tumorales REH, Sp2/O-Ag14 y MCF-7 o a las líneas REH y Sp2/O-Ag14, ambas previamente cultivadas con el vector que expresa la GFP. Como control, las células tumorales se infectaron directamente con cada uno de los aislamientos rotavirales, adicionando el rotavirus sin incubar con los glóbulos rojos, con un MOI de 1,8. Las células tumorales se incubaron a 37 °C por 12 hs y al cabo de este tiempo se cosecharon y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Las células se colectaron en tubos de microcentrifuga, se centrifugaron 400 X g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, posteriormente se añadió al botón de células 1 ml de buffer hipotónico para lisar los glóbulos rojos rojos (NH<sub>4</sub>Cl, 0,155M, Tris-HCL 0,17M, pH 7,65) por 30 minutos, se agitó suavemente, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. El lavado con buffer hipotónico se repitió 2 veces y al botón final se le adicionó PBS.

Otro método utilizado fue infectar células MCF-7 con glóbulos rojos-virus, sin modificar la cantidad de virus (MOI de 1.8), pero diluyendo los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos fueron usados en dilución creciente desde 1:10 hasta 1:1280 (25.000.000 a 19.531 glóbulos rojos, respectivamente). Como control se infectaron células MCF-7 con virus solos, no unidos a los glóbulos rojos.

Para la detección de antígenos virales en las células tumorales se colocaron aproximadamente 25.000 células en una laminilla cubreobjetos, las cuales se secaron a 50°C, se fijaron con metanol por 30 minutos y se incubaron con anticuerpo (Ac) policlonal anti-rotavirus -generado en nuestro laboratorio (dilución 1:2000)- en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS para retirar el exceso de anticuerpo, se aplicó anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (0.133 µg/ml) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavaron con PBS y se reveló con el sustrato BCIP/NTB (Sigma) en solución tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9,5. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.

Como los GR carecen de DNA nuclear, para distinguir las células tumorales de contaminación con GR que no se lisaron, las células se incubaron con la tinción fluorescente 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.1µg/ml), que se une al DNA. Para el análisis de los antígenos virales se usó un microscopio VanGuard. Se tomaron diez fotografías de cada laminilla con luz visible y la misma imagen para fluorescencia. Se contó el número total de células positivas y negativas para las proteínas rotavirales y luego se calculó el porcentaje de infección.

Para calcular el título viral como unidades formadoras de foco por ml (UFF/ml), se empleó la siguiente fórmula:  $20 \times \text{número de células infectadas} \times \text{el inverso del factor de dilución} \times \text{el número de campos contados}$  (NOTA: 20 corresponde a una constante para titular el virus en un volumen de 1 ml, obtenida al dividir 1000 µl (un mililitro) en 50 µl (volumen en el que se sembraron las células)). En las células tumorales que presentaban el vector que expresa la GFP, se evaluó el número de células fluorescentes y se graficó como porcentaje.

Se conoce que la infección por rotavirus inhibe la síntesis de proteínas celulares; por esto, se asume que al infectarlas debe disminuir la intensidad y/o el número de células tumorales fluorescentes. Así, la disminución de la intensidad o número de células fluorescentes indica indirectamente que hubo infección de los aislamientos rotavirales. La infección, evaluada como presencia de antígenos virales, se hizo mediante inmunocitoquímica. Se tomaron fotografías representativas con luz visible para inmunocitoquímica y con fluorescencia para evaluar la proteína GFP.

### **3.12. Aislamiento de fracciones enriquecidas de membranas citoplasmáticas de glóbulos rojos**

Otra manera de analizar si la unión de los rotavirus a los glóbulos rojos no impide la infección a células tumorales, fue utilizar fracciones enriquecidas de membranas citoplasmáticas. Para realizar el aislamiento de estas fracciones se siguió la metodología descrita por Lin y colaboradores, a la cual se realizaron algunas modificaciones. (Lin *et al.*,1987). Aproximadamente 60.000.000 de glóbulos rojos se incubaron con 1 ml de buffer de lisis (Sacarosa 50mM, HEPES 5 mM pH 7.4) en presencia del inhibidor de proteasas fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF, 1mM). Se homogenizó manualmente con un homogenizador mecánico por 5 minutos, se adicionó 100 µl de CaCl<sub>2</sub> (50 mM) y se

homogenizó la muestra por 10 minutos más. El contenido se pasó a viales de 2 ml, se centrifugó a 3422 x g por 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se realizó una segunda centrifugación a 19710 x g por 30 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS con azida de sodio al 1%. En cada pozo de la placa se puso 2µl de la fracción enriquecida de membranas de GR que contenía 348,6 µg/ml de proteína total, determinada en un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop® ND-1000).

La fracción enriquecida de membranas se incubó con los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5 y O-ECwt (cada aislamiento con MOI de 3.6, 1.8, 0.9, 0.45), durante 1h a 37 °C y se lavó tres veces con medio sin SFB para retirar el virus no unido, centrifugando a 19710 x g por 5 minutos a 4°C. La mezcla (membranas GR-rotavirus) se adicionó a  $5,0 \times 10^4$  células/ml de la línea tumoral MCF-7. Se incubó por 12 h y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. La infección se evaluó con inmunocitoquímica y se reveló utilizando como sustrato aminoetilcarbazol (AEC) 0.64 mg/ml, buffer acetato (acetato de sodio 30 mM, ácido acético 12 mM), pH 5.0 y peróxido de hidrógeno al 0.36%. El AEC se preparó previamente a una concentración de 4 mg/ml en dimetilformamida. Como control se emplearon células MCF-7 infectadas con el rotavirus (MOI 3.6, 1.8, 0.9, 0.45) sin fracciones enriquecidas de membrana.

### **3.13. Infección de la línea tumoral MCF-7 con rotavirus unido a glicoforina A o a suero fetal bovino**

La glicoforina A es una glicoproteína integral de membrana plasmática de los eritrocitos con 131 residuos de aminoácidos, tienen residuos de ácido siálico que confiere carga negativa. Es la glicoproteína más abundante en los GR y puede unir microorganismos como virus y bacterias. Por esta razón, se quiso determinar si la unión de la glicoforina A en forma soluble inhibe la capacidad infecciosa de los rotavirus a la línea tumoral MCF-7. Para esto, 20 mg/ml de glicoforina A (Sigma) en un volumen final de 50 µl se incubó con los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5 y O-ECwt (cada aislamiento con MOI de 3.6, 1.8, 0.9, 0.45), durante 1h a 37 °C, se adicionó a  $5,0 \times 10^4$  células/ml de la línea tumoral MCF-7 y se procedió como se describió al incubar las fracciones de membranas de glóbulos rojos.

Dado que el suero fetal bovino (SFB) es rico en glicoproteínas, para determinar si dichas proteínas se unen a los aislamientos rotavirales y afectan la infección, SFB al 10%, en medio de cultivo MEM, se incubó con los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5 y O-ECwt (cada aislamiento con MOI de 3.6, 1.8, 0.9, 0.45), durante 1h a 37 °C, se adicionó a  $5,0 \times 10^4$  células/ml de la línea tumoral MCF-7 y se procedió como se describió al incubar las fracciones de membranas de glóbulos rojos.

### **3.14. Determinar la infección del rotavirus O-Ecwt en tejido normal al aplicarlo vía endovenosa a un ratón**

Pruebas experimentales en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina han demostrado que los rotavirus WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5, O-Ecwt no infectan células normales *in vitro*. Para determinar si la unión de los rotavirus a los glóbulos rojos modifica la infección a tejido normal, TLPs purificadas por CsCl<sub>2</sub> de la cepa homóloga O-ECwt se inocularon vía endovenosa (aproximadamente 80.000 partículas en 20 µls) en la vena de la cola de dos ratones adultos. Un ratón se sacrificó a las 24 h y otro a las 48 h, se extrajeron los órganos internos y se enviaron a patología para hacer cortes histológicos según procedimiento estándar. Los cortes se desparafinaron y rehidrataron por inmersiones secuenciales en xilol (xilol I: 5 minutos y xilol II: 5 minutos), etanol (alcohol 100%: 5 minutos; alcohol 96%: 5 minutos; alcohol 75%: 5 minutos) y agua destilada (5 minutos). Los cortes histológicos desparafinados se sumergieron en una solución de tritón al 1% durante 20 min para permeabilizarlos.

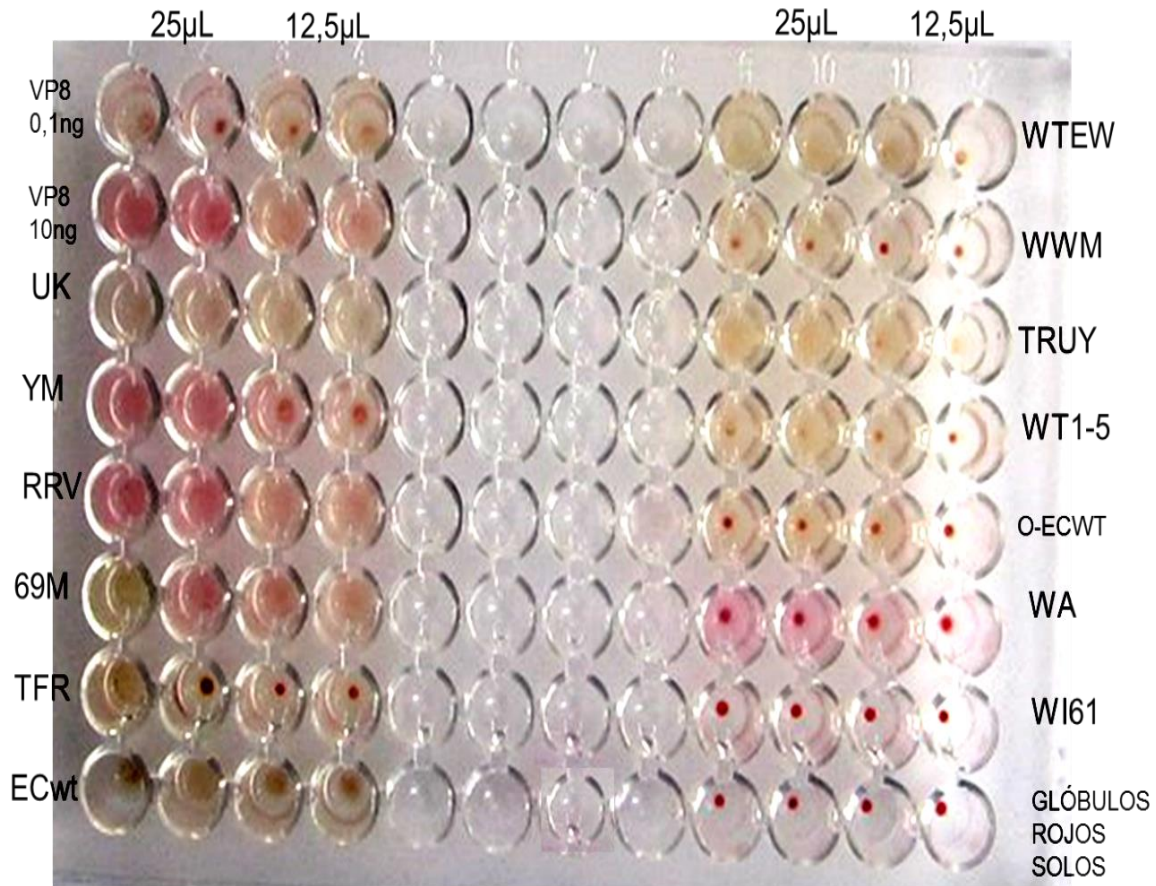
Se evaluó la presencia de antígenos rotavirales en cada uno de los órganos examinados (hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón y cerebro) utilizando anticuerpos policlonales generados en conejo anti-rotavirus, que reconocen proteínas estructurales y no estructurales (1:2000). Se adicionó anticuerpo secundario policlonales IgG de anti-conejo conjugado con ALEXA-568 (2mg/mL) y se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 20 minutos protegiendo de la luz y se evaluó mediante epifluorescencia en un microscopio de fluorescencia (VanGuard).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY hemaglutinan parcialmente.

Para determinar si los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5, O-ECwt tienen la capacidad de aglutinar los GR, se realizó un ensayo de hemaglutinación (Figura 4-1). Los glóbulos rojos tipo O+, fueron purificados con Ficol-hypaque, como se describe en la metodología. Estos fueron usados en una concentración final del 0,5 % en PBS con albumina de suero bovino al 0,125 %; los rotavirus activados se usaron en diluciones 1:2, partiendo de 25  $\mu$ l (MOI 18) y se incubó por 30 minutos a 4°C.

Teniendo en cuenta los controles positivos (RRV, YM, TFR, y la proteína recombinante VP8 de RRV (10 ng) y negativos de la hemaglutinación (Wa, WI61, M69, ECwt y glóbulos rojos sin virus), se observó que los aislamientos rotavirales Wt1-5, WWM y O-ECwt no tienen capacidad hemaglutinante en las concentraciones utilizadas. Los virus WTEW y TRUY no formaron una malla típica de hemaglutinación, pero tampoco una precipitación o botón de GR en la parte inferior del pozo. Se observó la formación de un anillo de células aglutinadas alrededor de un botón en el centro, sugiriendo que estos rotavirus aglutinaron parcialmente los eritrocitos.



**Figura 4-1. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY hemaglutinan parcialmente; los aislamientos Wt1-5, WWM y O- ECwt no aglutinan los glóbulos rojos.** Se purificaron los eritrocitos mediante Ficol-Hypaque. Los glóbulos rojos tipo O+ se resuspendieron en una concentración final de 0,5 % en PBS con albumina de suero bovino al 0,125 %. Se agregaron los aislamientos rotavirales realizando diluciones seriadas (1:2). Los rotavirus RRV, YM, TFR y la proteína recombinante VP8 del rotavirus RRV fueron usados como controles positivos de hemaglutinación. Los rotavirus Wa, WI61, M69 Y ECwt fueron usados como controles negativos de hemaglutinación.

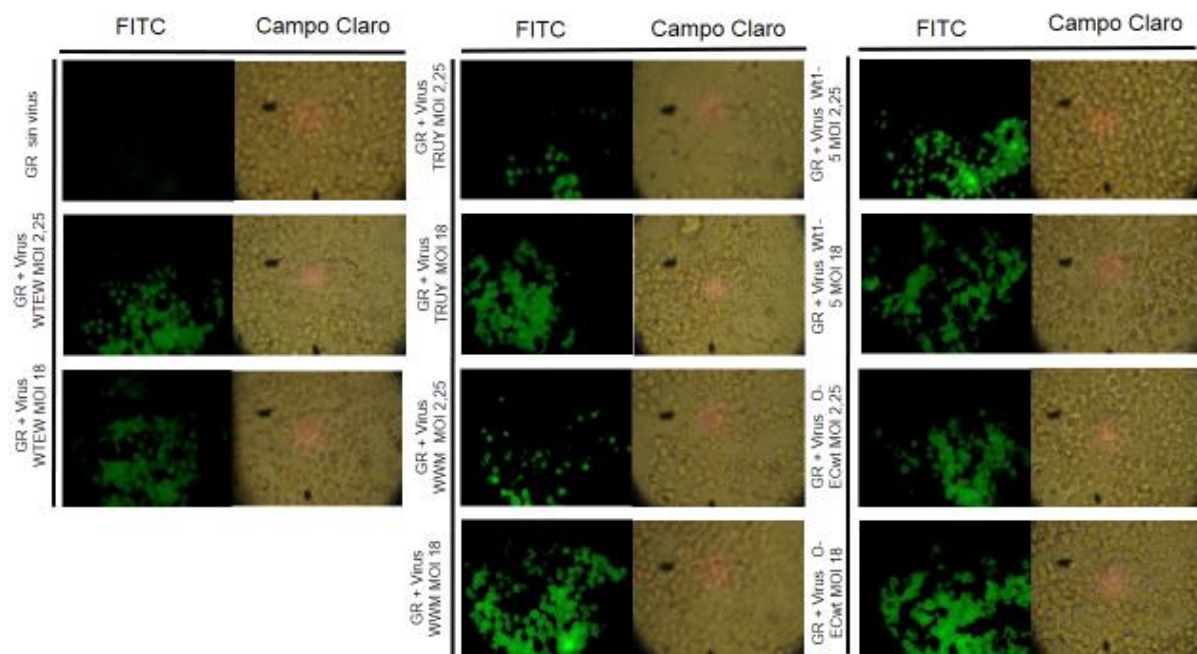
#### **4.2. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y O- ECwt se unen a los glóbulos rojos**

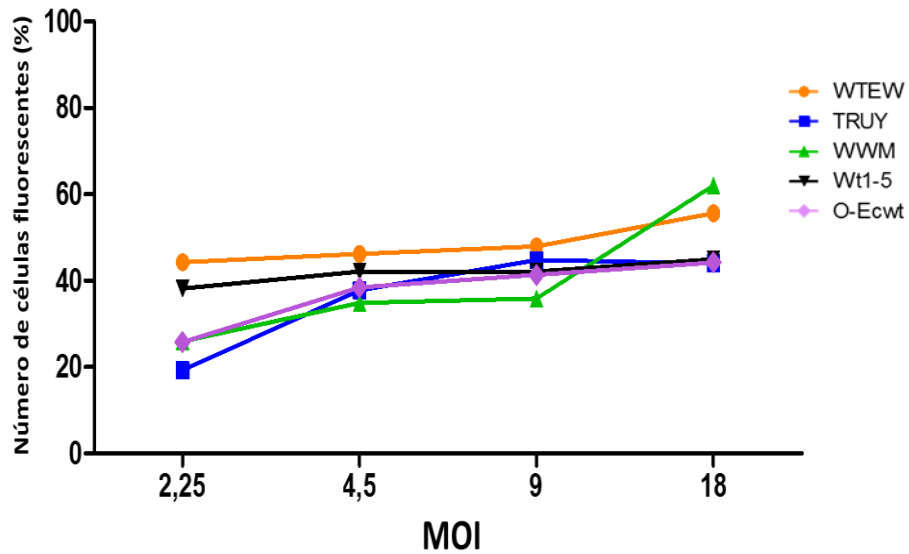
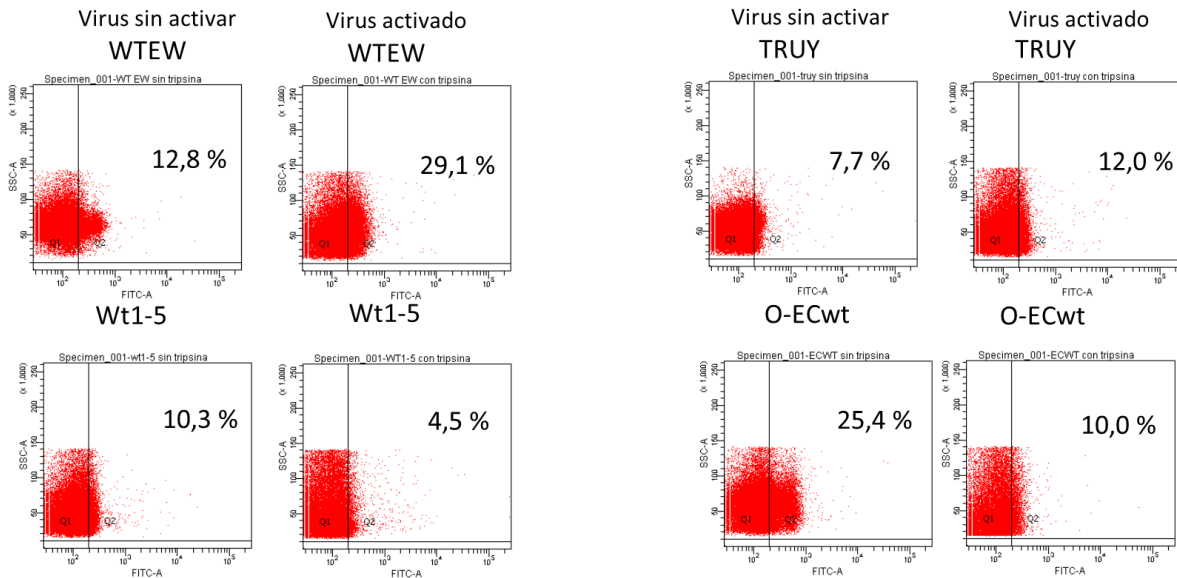
Se conoce que la unión de los rotavirus a los GR está mediada por la interacción de la proteína VP4 del virus al AS presente en la superficie de los eritrocitos. Para determinar la unión de los aislamientos rotavirales, diferentes MOI (18, 9, 4,5, 2.25) fueron incubados con los GR durante 1 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se fijó con paraformaldehído al 4 %, se lavó y se evaluó la unión con anticuerpo policlonal anti-rotavirus y un anticuerpo conjugado con FITC. Como controles negativos se usaron glóbulos rojos sin virus incubados con los anticuerpos. Mediante epifluorescencia se tomaron fotos

representativas, se contaron las células fluorescentes y no fluorescentes y se obtuvo el porcentaje (Figura 4-2 A).

El resultado muestra una tendencia similar en el número de células fluorescentes en los cinco aislamientos rotavirales sin variaciones significativas entre ellos. A pesar de utilizar diluciones 1:2 en cada rotavirus, no se observó una disminución proporcional de la fluorescencia. Para el MOI más bajo, 2.25, el promedio en el número de células fluorescentes para los cinco aislamientos fue de 30.70; para el MOI 4.5, fue de 39.89; para MOI 9 fue de 42.42 y para 18 de 50.17 (Figura 4-2 B). Esto ocurre probablemente porque hay partículas no infecciosas (DLPs) que también pueden unirse a los GR e impiden ver un efecto claro de dilución. Adicionalmente, se evaluó la unión de los virus a los GR con citometría de flujo (Figura 4-2 C). En este ensayo se comparó el porcentaje de unión del virus activado con tripsina con el porcentaje de unión de los virus no tratados con tripsina. Los porcentajes de unión para WTEW sin tripsina fueron de 12.8 y con tripsina 29.1, para el virus TRUY 7.7 sin tripsina y 12.0 con tripsina. En el aislamiento WT1-5 10,3 sin tripsina y 4,5 con tripsina, con O-ECwt los porcentajes fueron 25.4 sin tripsina y 10 con tripsina. Estos resultados además de confirmar la unión de los virus a los GR, indican que los rotavirus utilizados en este trabajo no requieren de la activación para la unión a la membrana de las células, aunque su capacidad de unión aumenta.

**A**



**B****C**

**Figura 4-2. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y ECwt se unen a los glóbulos rojos. A.** Los glóbulos rojos fueron incubados con los aislamientos rotavirales durante 1h a 37 °C; usando un MOI de 2.25, 4.5, 9 y 18. Se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se evaluaron los antígenos rotavirales mediante inmunofluorescencia. Como control negativo se usaron glóbulos rojos sin virus incubados con los anticuerpos. **B.** Porcentaje de células fluorescentes. Se tomaron 10 fotografías representativas, en un microscopio (VanGuard), se contó el número total de células (fluorescencia positiva y negativa) y se calculó el porcentaje de fluorescencia. **C.** Se evaluó la unión de los aislamientos rotavirales a los GRs mediante citometría de flujo.

#### **4.3. Los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y O-Ecwt unidos a los glóbulos rojos, infectan células tumorales REH, SP2/O-Ag14 y MCF-7.**

Dado que los aislamientos rotavirales se unen a los glóbulos rojos con porcentajes entre el 30% y el 50%, se quiso evaluar si dicha unión afecta la infectividad del rotavirus en líneas tumorales REH Y MCF-7. Se purificaron los glóbulos rojos, se incubaron 1 h a 37 °C con los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5, y O-Ecwt (cada virus con MOI de 0.22, 0.45, 0.9, 1.8). Luego se lavaron, se adicionaron a las células tumorales durante 12 h. a 37 °C y se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Se lisaron los GR como se describe en métodos y se evaluó el porcentaje de células infectadas mediante inmunocitoquímica (Figura 4-3A). Como control, las células tumorales se infectaron directamente, sin GR, con cada uno de los aislamientos rotavirales (MOI de 1,8).

Las células tumorales REH Y MCF-7 infectadas directamente con los virus, presentaron un porcentaje de infección alrededor del 80% en las dos líneas celulares. Al comparar este resultado con los obtenidos en células incubadas con los glóbulos rojos-virus, se observó una disminución de la infección aproximadamente en 20% para el mismo MOI (1.8), sugiriendo que los glóbulos rojos retienen aproximadamente un 20% de rotavirus que no logran infectar las células tumorales (Figura 4-3B). Al comparar el porcentaje de infección entre los diferentes MOI (1.8, 0.9, 0.45, 0.22) se observó que la infección disminuye al reducirse el MOI. La disminución es mayor en las células REH comparada con las células MCF-7. Con REH el porcentaje de infección con un MOI de 1.8 fue de 61,6 % y el del MOI más bajo fue de 31.3%. Para las células MCF-7 en estas mismas concentraciones los resultados obtenidos fueron de 67.7% y 51.1%, respectivamente.

Igualmente, se quiso evaluar el porcentaje de destrucción celular en las líneas tumorales, pretendiendo tener otra evidencia de infección y oncolisis de los aislamientos rotavirales en las líneas tumorales. Para esto, se evaluó la presencia de fragmentos celulares. Sin embargo, el resultado fue paradójico, encontrando un porcentaje de lisis celular menor en las células que fueron infectadas solo con el virus, respecto a la glóbulos rojos-virus. También llamó la atención que en las células infectadas con los glóbulos rojos-virus este porcentaje no cambió de manera significativa con relación al MOI y en algunos casos la destrucción fue levemente mayor para los MOI más bajos. Probablemente hay un artefacto ocasionado por los restos de fragmentos celulares que producen los glóbulos

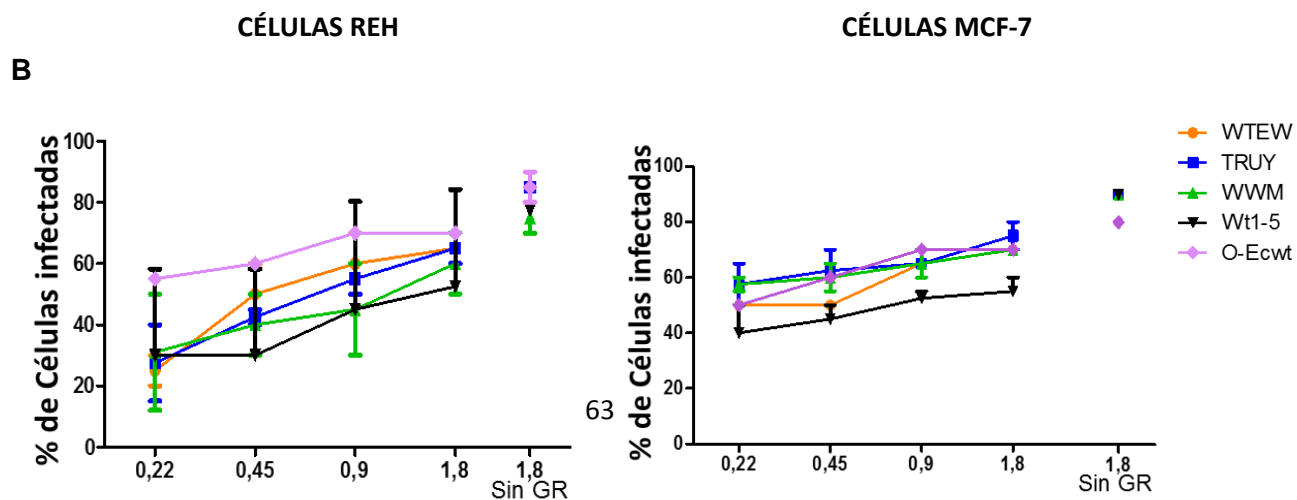
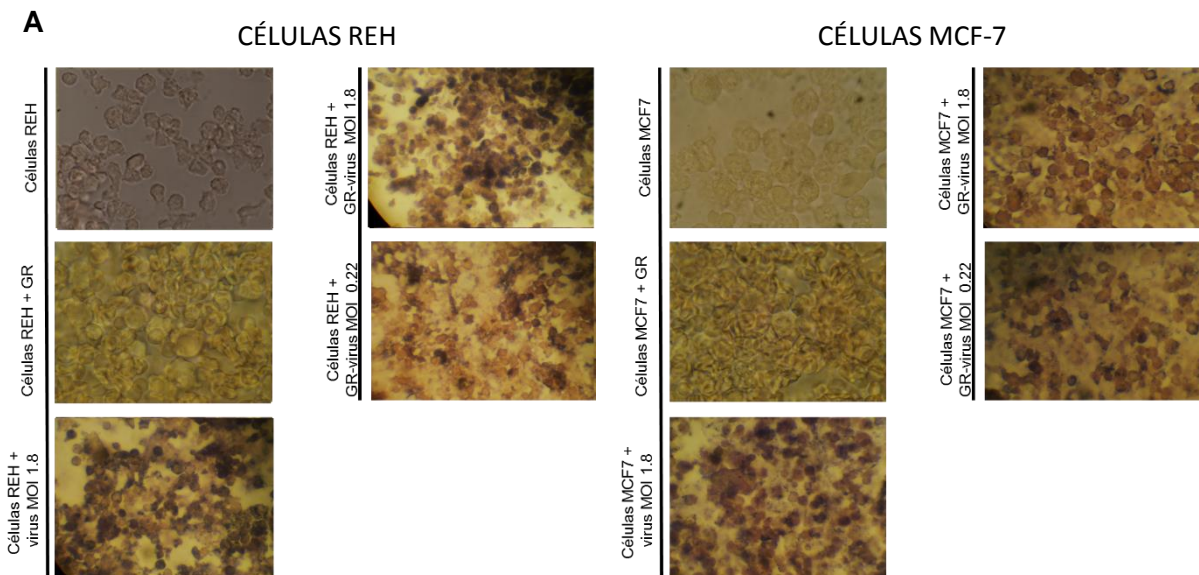
rojos cuando se lisan con el buffer hipotónico, invalidando el resultado (datos no mostrados).

Para corroborar la diferencia en el porcentaje de infección, cuando se infectan las líneas tumorales, con el virus solo respecto a cuando se infectan las mismas células tumorales adicionando glóbulos rojos-virus (20%), se hizo un ensayo en las células MCF-7. Para este caso, las células MCF-7 se infectaron con glóbulos rojos-virus, sin modificar la cantidad de virus (MOI de 1.8), pero diluyendo los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos fueron usados en dilución creciente desde 1:10 hasta 1:1280 (25.000.000 a 19.531 glóbulos rojos, respectivamente). Los datos obtenidos indican que a menor cantidad de GR, mayor es el porcentaje de infección; con dilución 1:10 se obtuvo 49,75 % de infección y con 1:1280: 89,75 % (Figura 4-3 C). Este resultado apoya la idea que el 20% de diferencia en la infección observado en el primer experimento, cuando se deja fija la cantidad de glóbulos rojos y se diluye el virus, se relaciona con el porcentaje de virus que se une a los glóbulos rojos y esto retarda o impide la infección a la línea tumoral, por lo menos de un porcentaje de virus (20%).

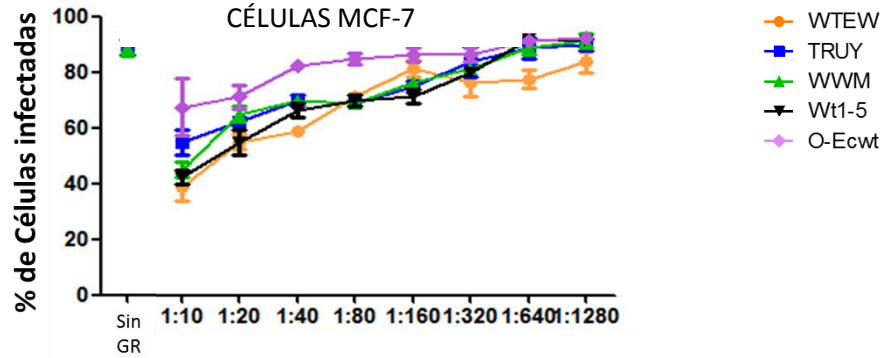
Otro método empleado para determinar que la unión de los rotavirus a los GR no impide la infección a células tumorales, fue adicionar glóbulos rojos-virus a las líneas tumorales SP2/O-Ag114 y REH, que expresan la proteína verde fluorescente. Se conoce que la infección por rotavirus inhibe la síntesis de proteínas celulares; por esto, se asume que al infectarlas debe disminuir la intensidad y/o el número de células tumorales fluorescentes.

Las líneas celulares REH y SP2/O-Ag14 no infectadas que expresan la GFP, presentaron un número de células fluorescentes de aproximadamente 90%. En las células REH infectadas con los rotavirus sin glóbulos rojos (MOI 1.8), el porcentaje de fluorescencia bajó en promedio a 37 %. En las células REH incubadas con los virus unidos a los glóbulos rojos con MOI de 1.8, el promedio de células fluorescentes fue de 22.6%. No hay grandes diferencias entre los diversos MOI: MOI de 0.9: 29.0%; MOI de 0.45: 26.0%; MOI de 0.22: 32.3%. En las células SP2/O-Ag14 infectadas con el virus solo, el porcentaje de células fluorescentes disminuyó en promedio hasta el 29 %. Para las células SP2/O-Ag14 incubadas con los glóbulos rojos-virus, el porcentaje de células fluorescentes fue así: con MOI de 1.8: 30,5%; MOI de 0.9: 35,7%; MOI de 0.45: 36,7%; MOI de 0.22: 39,8% (Figura 4-3D).

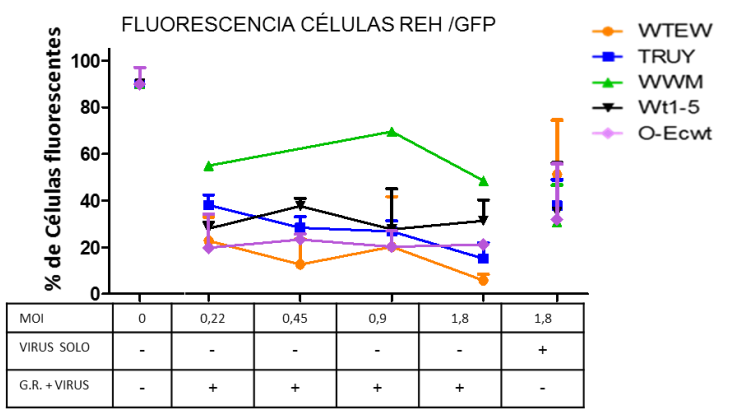
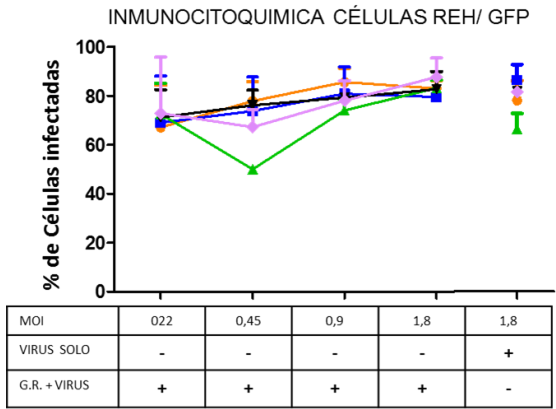
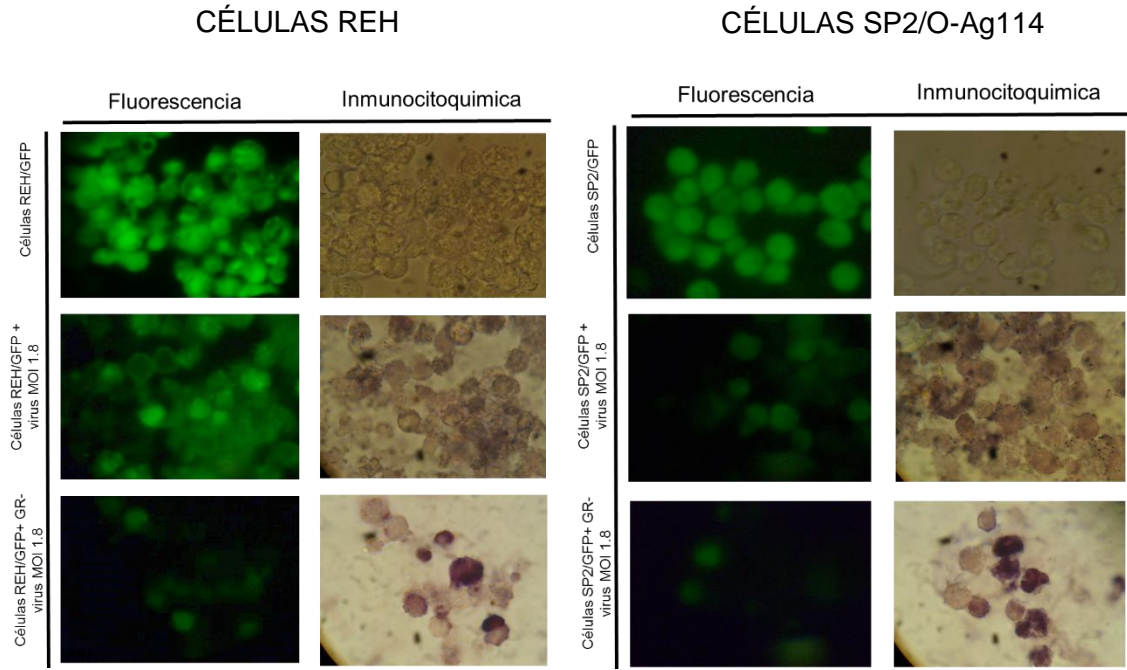
Al evaluar el porcentaje de infección mediante inmunocitoquímica revelada con fosfatasa alcalina, las células REH infectadas con los rotavirus (MOI 1.8) sin glóbulos rojos, presentaron un 78,7 % de positividad a la fosfatasa alcalina. Para las células REH incubadas con los glóbulos rojos-virus el porcentaje de células positiva fue así: con MOI de 1.8: 83,3 %; MOI de 0.9: 79,7%; MOI de 0.45: 71,2%; MOI de 0.22: 70,6 %. Para las células SP2/O-Ag14 infectadas con los rotavirus (MOI 1.8) sin glóbulos rojos, presentaron un 93,3% de positividad a la fosfatasa alcalina. Para las células SP2/O-Ag14 incubadas con los glóbulos rojos-virus, el porcentaje de células positiva fue así: con MOI de 1.8:89,2%; MOI de 0.9: 91,0%; MOI de 0.45: 79,3%; MOI de 0.22: 81,4%) (Figura 4-3D).

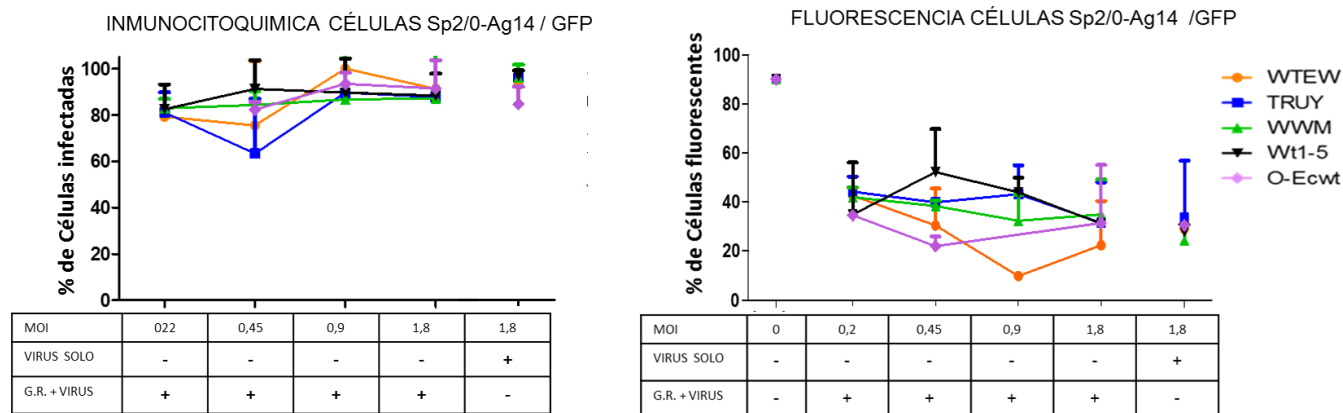


C



D





**Figura 4-3. La unión de los aislados rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y O- Ecwt a los glóbulos rojos no afecta su capacidad infecciosa. A.** Las células tumorales REH (A1) y MCF-7 (A2) fueron incubadas con los glóbulos rojos- virus durante 12 h. a 37 °C. Se utilizó un MOI entre 0.2 y 1.8. Se evaluó el porcentaje de células infectadas mediante la técnica de inmunocitoquímica. Como control negativo se usaron células sin infectar y células sin infectar + glóbulos rojos. El control positivo fueron células infectadas con rotavirus sin glóbulos rojos. **B.** Se evaluó el porcentaje de células infectadas **C.** Las células MCF-7 fueron incubadas con los glóbulos rojos-virus (MOI viral de 1.8). Los glóbulos rojos se adicionaron en dilución creciente. **D.** Epifluorescencia e inmunocitoquímica de las líneas celulares REH y SP2/O-Ag114 que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) infectadas con rotavirus solos o con glóbulos rojos-virus.

#### 4.4. La unión de los aislamientos rotavirales a glicoproteínas no impide la infección de células tumorales

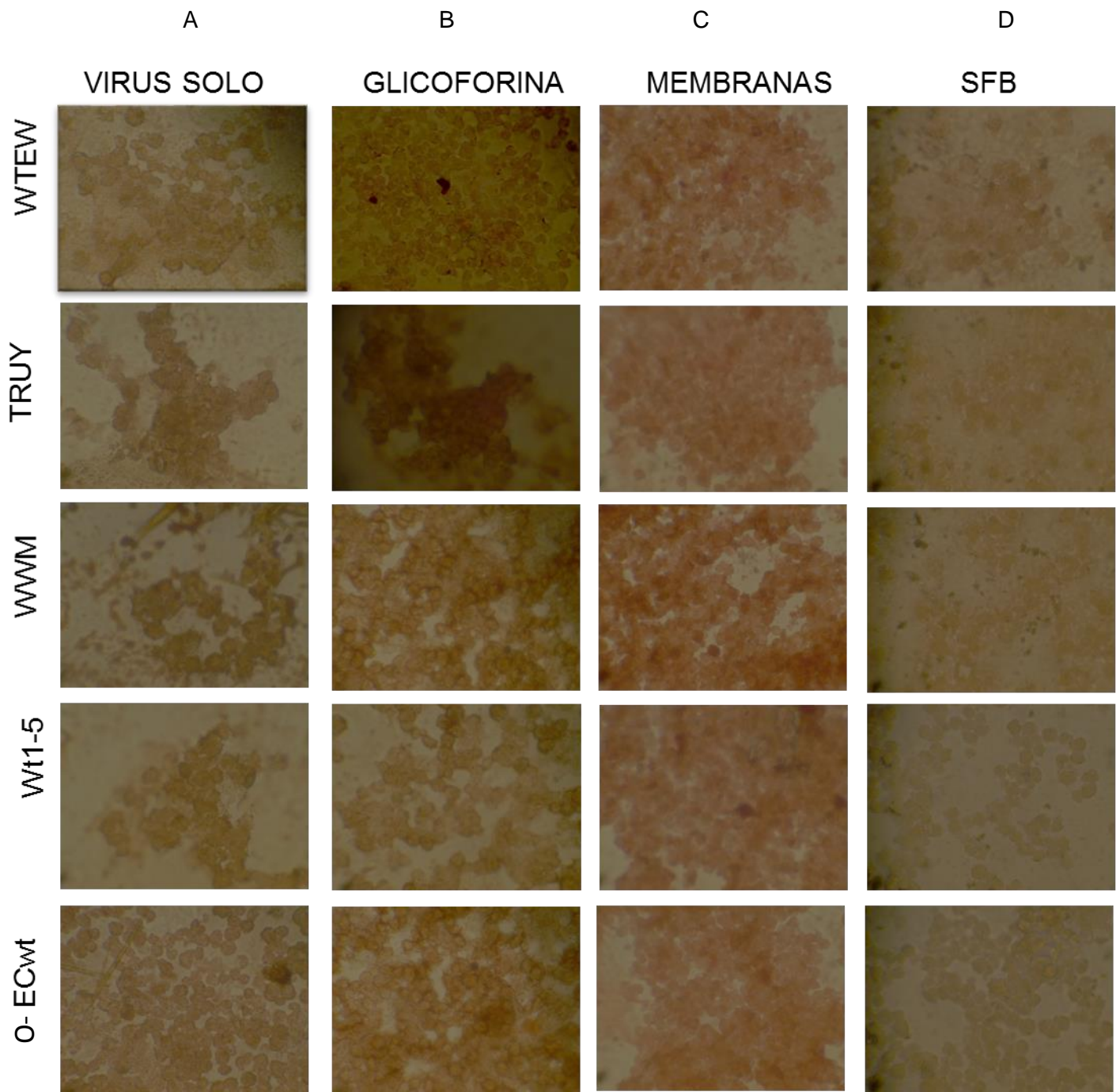
La unión de los aislamientos rotavirales a los glóbulos rojos no impidió que el rotavirus infectara las células tumorales. Para corroborar esto, los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5, O-ECwt activados previamente con tripsina se incubaron durante una hora a 37°C, con suero fetal bovino (SFB) al 10%, glicoforina A comercial (20 µg/ml en un volumen total de 50 µls) y membranas citoplasmáticas enriquecidas de glóbulos rojos (348,6 µg/ml). Las células tumorales MCF-7 fueron incubadas con este complejo durante 12 horas, se fijaron con paraformaldehído al 4% y el porcentaje de infección se evaluó con la técnica de inmunofluorescencia descrita antes. Como control, se incubaron las células tumorales MCF-7 con el virus solo.

Los resultados obtenidos fueron heterogéneos y dependen del aislamiento rotaviral. (Figura 4-4) Cuando se comparó el porcentaje de infección en las células infectadas con el virus solo y los virus incubados con las fracciones de membrana y el SFB, se observó que

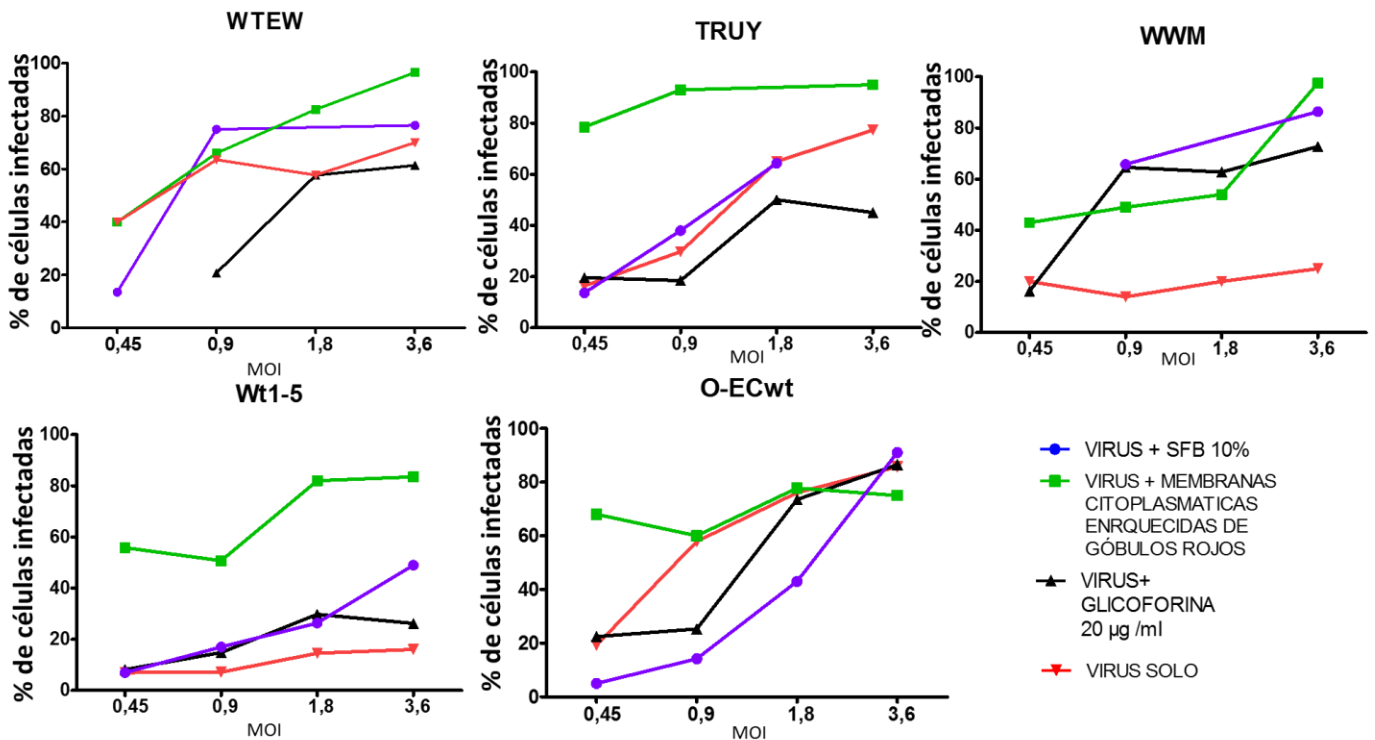
los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM Y Wt1-5 presentaban un mayor porcentaje de infección, con el virus O-ECwt la infección fue menor. En el caso de los virus incubados con la glicoforina A, el porcentaje de infección fue mayor en los aislamientos WWM y WT1-5, comparados con el control (virus solo). O-ECwt-unido a la glicoforina A no difiere en el porcentaje de infección con los virus solos. Los aislamientos WTEW y TRUY infectan en menor porcentaje las células cuando están unidos a la glicoforina A. En la Tabla 4-1, se muestran los porcentajes de infección para los aislamientos rotavirales en los diferentes MOI.

**Tabla 4-1. Porcentaje de infección de los aislamientos rotavirales incubados con SFB, Fracciones de membrana y Glicoforina A.**

Aislamiento rotaviral	Virus solo (sin Glicoforina, SFB o Fracciones de membrana)		SFB		Fracciones de membrana		Glicoforina A	
	MOI	Porcentaje de infección	MOI	Porcentaje de infección	MOI	Porcentaje de infección	MOI	Porcentaje de infección
WTEW	3.6	69,9	3.6	76,5	3.6	96,5	3.6	61,3
	1.8	57,7	1.8		1.8	82,5	1.8	57,6
	0.9	63,4	0.9	75	0.9	66,0	0.9	20,7
	0.45	40,0	0.45	13,5	0.45	40,0	0.45	
TRUY	3.6	77,3	3.6		3.6	95,0	3.6	45,0
	1.8	65,0	1.8	64,3	1.8		1.8	50,0
	0.9	29,8	0.9	38,0	0.9	93,0	0.9	18,4
	0.45	16,4	0.45	13,7	0.45	78,5	0.45	19,6
WWM	3.6	25,0	3.6	86,4	3.6	97,5	3.6	72,7
	1.8	20,0	1.8		1.8	54,0	1.8	62,8
	0.9	14,0	0.9	65,8	0.9	49,0	0.9	64,6
	0.45	20,0	0.45		0.45	43,0	0.45	16,12
Wt1-5	3.6	16,0	3.6	49,0	3.6	83,5	3.6	26,2
	1.8		1.8	26,4	1.8	82,0	1.8	29,8
	0.9	14,5	0.9	17,0	0.9	50,7	0.9	14,8
	0.45	7,22	0.45	7,0	0.45	55,8	0.45	8,1
O-ECwt	3.6	85,7	3.6	91	3.6	75	3.6	86,5
	1.8	76,0	1.8	43	1.8	77,8	1.8	73,5
	0.9	57,9	0.9	14,2	0.9	60	0.9	25,3
	0.45	19,2	0.45	5,0	0.45	68	0.45	22,4



E

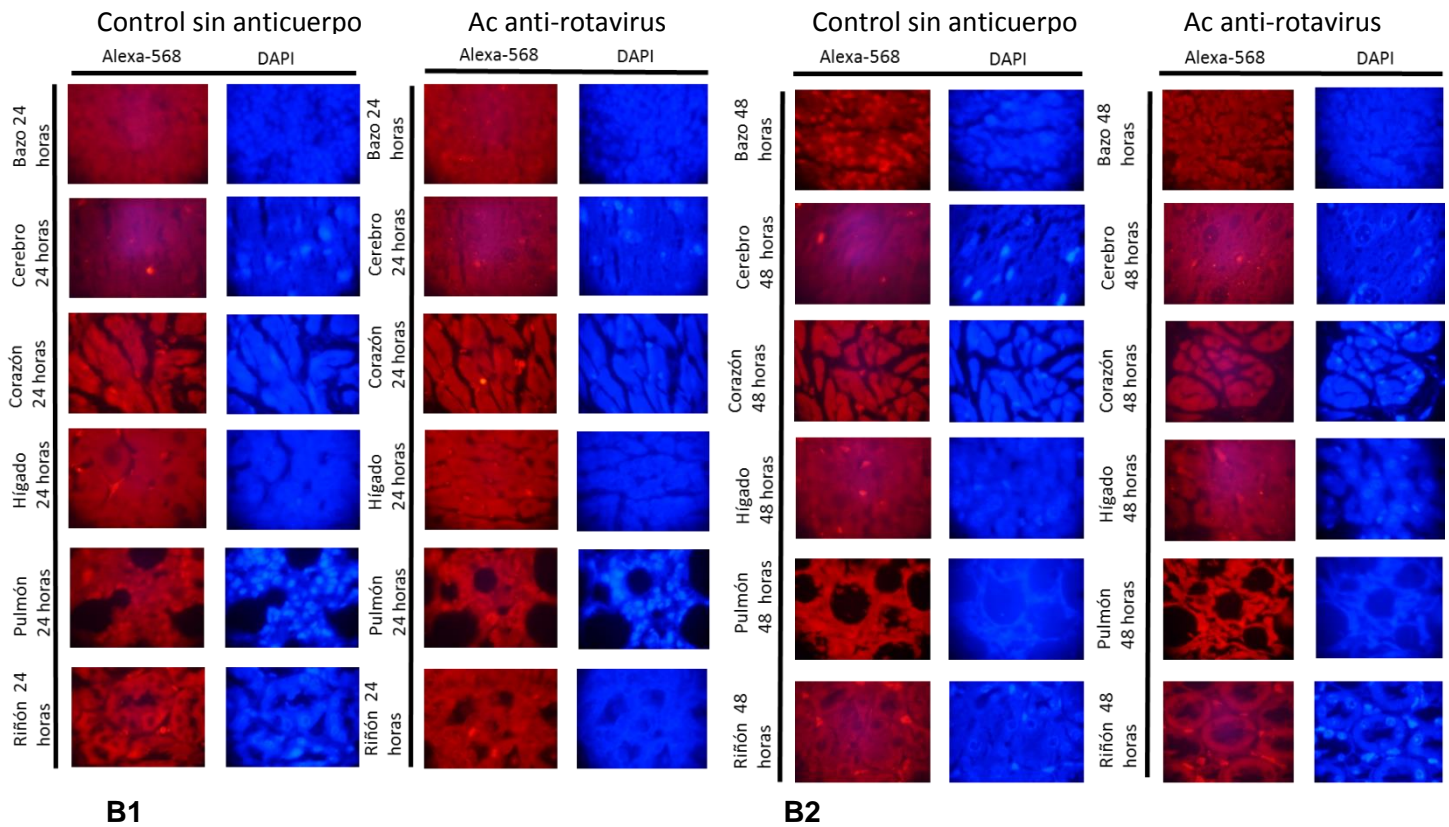
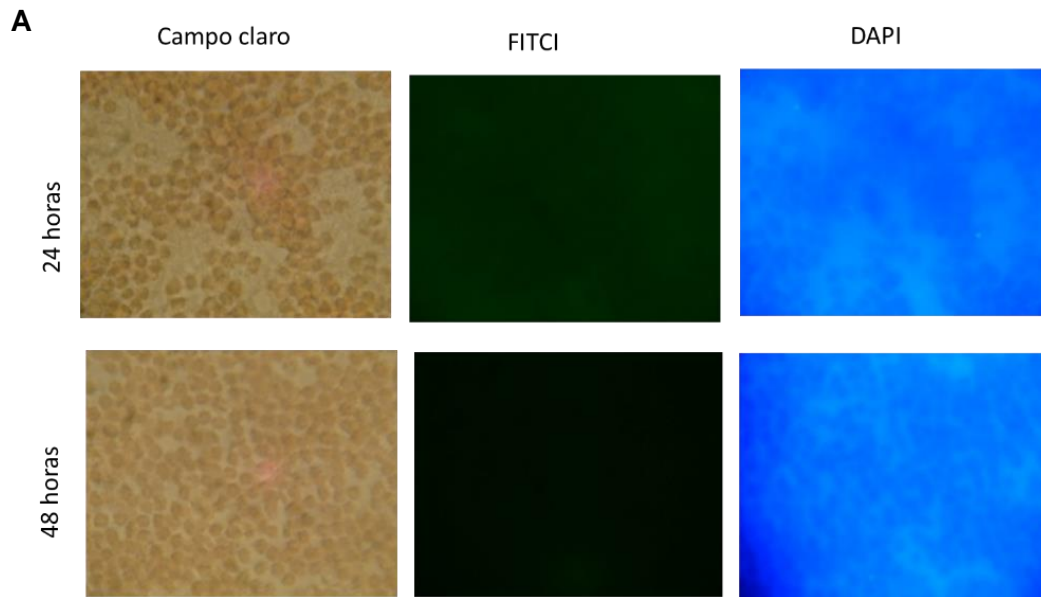


**Figura 4-4. La unión del rotavirus a los glicoforina, SFB, o membranas enriquecidas de glóbulos rojos, no afecta la capacidad infecciosa de los aislados rotavirales WTEW, TRUY, Wt1-5, WWM y ECwt.** Los aislamientos rotavirales fueron incubados con Glicoforina, fracciones enriquecidas de membranas de glóbulos rojos y SFB durante 1 h a 37 °C, se adicionaron a células MFC7 y se incubaron por 12 h. La infección se evaluó por inmunocitoquímica. A. Células infectadas con rotavirus. B. Células con rotavirus incubado con glicoforina. C. Células con rotavirus incubado con fracciones enriquecidas de membranas de glóbulos rojos. D. Células con rotavirus incubado con SFB (10 %). E. Porcentaje de células infectadas con rotavirus incubado con glicoforina o fracciones enriquecidas de membrana o SFB 10%.

#### 4.5. El aislamiento rotaviral O-ECwt no infectan los tejidos normales de ratones ICR adultos

Trabajos previos realizados en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, determinaron que los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WMW, Wt1-5, O-Ecwt no infectan células normales *in vitro*. Para establecer si el aislamiento rotaviral O-ECwt infecta tejido normal *in vivo*, se inocularon TLPs del virus O-ECwt vía endovenosa en la cola de dos ratones adultos. Los ratones se sacrificaron, se extrajeron los órganos y se enviaron a patología para hacer cortes histológicos. En dichos cortes se determinó mediante inmunofluorescencia la presencia de antígenos rotavirales en sangre periférica y en cada uno de los órganos

examinados (hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón y cerebro). El resultado de la inmunofluorescencia en todos los casos fue negativo (Figura 4-5).



**Figura 4-5. El aislamiento rotaviral O-ECwt no infecta los tejidos normales del ratón.** Dos ratones adultos ICR fueron inoculados con TLPs purificadas del virus O-ECwt vía endovenosa en la cola. Los ratones

fueron observados por 24 y 48 horas, se sacrificaron, se extrajeron los órganos internos y se enviaron a patología para hacer cortes histológicos. Se realizó inmunofluorescencia de la sangre periférica utilizando un anticuerpo antirotavirus (**A**) y de los órganos. (Hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón y cerebro). (**B**) Ratón 24 horas **B1**. Ratón 48 horas **B2**.

## 5. DISCUSIÓN

Algunas cepas de rotavirus de origen animal tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos y esta aglutinación es mediada por la interacción de VP4 con el ácido siálico (AS) presente en la superficie de los eritrocitos. El dominio responsable de esta interacción se encuentra en el fragmento VP8 de VP4 (Isa *et al.*, 2006). Para determinar si los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5 y O-ECwt tienen la capacidad de aglutinar los GR, se realizó un ensayo de hemaglutinación. En este se observó que los aislamientos rotavirales Wt1-5, WWM y O-ECwt no tienen capacidad hemaglutinante en las concentraciones utilizadas. Los virus WTEW y TRUY aglutinaron parcialmente los eritrocitos.

El comportamiento de estos aislamientos rotavirales frente a la hemaglutinación, puede estar relacionado con el origen de estos, ya que provienen de la mezcla de cepas rotavirales con o sin capacidad de hemaglutinar. De la mezcla de los virus TRF, RRV, YM (virus hemaglutinantes) y UK (no hemaglutinante) se obtuvo el aislamiento TRUY, cuya capacidad para hemaglutinar sugiere que el virus conserva la estructura parental de la proteína VP4 de alguno de los virus hemaglutinantes. Sin embargo, llama la atención que la hemaglutinación sea parcial, respecto a los parentales hemaglutinantes. Esto se explica si hubo mutaciones en los aminoácidos de VP4 (aminoácidos 93-208). Estudios han reportado mutaciones en los aminoácidos 150, 180, 187, 183, 190, 194 en variantes rotavirales RRV, SA11 y OSU. (Ludert *et al.*, 1998; Méndez *et al.*, 1996; Ciarlet *et al.*, 1999; Giammarioli *et al.*, 1996). Estas mutaciones resultaron en la pérdida de la capacidad de hemaglutinación de los rotavirus y en la pérdida de la exigencia del AS para infectar eficientemente. La probabilidad de estas mutaciones aumenta en los rotavirus ya que presentan un genoma de ARN, más sensible al cambio.

WWM proviene de la mezcla de los virus Wi y Wa; estos virus son de origen humano y no posee la capacidad de aglutinar los GRs. En este caso el comportamiento, resultó a lo esperado teóricamente. WTEW es resultado de la mezcla de los rotavirus TRUY, WWM, WT1-5 y O-Ecwt. Dado que WWM, WT1-5 y O-Ecwt no son hemaglutinantes y TRUY tiene una hemaglutinación parcial, se deduce que WTEW conserva las características de la VP4 de TRUY.

Los virus que pueden hemaglutinar reconocen el ácido siálico terminal de la superficie de los glóbulos rojos a través de la proteína VP8, sin embargo esto no indica que los virus no hemagutinantes no tengan la capacidad de unirse a las células en general. Se conoce que estos virus no hemaglutinantes se unen al AS interno presente en algunos gangliosidos en las membranas citoplasmáticas, como GM1. Esto ha llevado a suponer que tanto los aislamientos que hemaglutinan como los que no, pueden unirse a los glóbulos rojos a través de otros azúcares (Kuhlenschmidt *et al.*, 1999; Kraschnefski *et al.*, 2009).

Por esto, evaluamos los aislamientos rotavirales en cuanto a su capacidad de unión a los GRs. Para ello, diferentes MOI de los virus se incubaron con los GR por 1 h a 37 °C y se evaluó la unión con inmunofluorescencia. El resultado muestra que si hay unión de los cinco aislamientos rotavirales a los glóbulos rojos, con porcentajes de unión similares entre ellos. Esta capacidad de unión de los virus a los glóbulos rojos se ha reportado en adenovirus, con un porcentaje de unión del 90 % *ex vivo* (Lyons *et al.*, 2006).

Con relación a los diferentes MOI usados, no se observó un efecto de dilución. Este resultado sugiere la presencia de partículas no infecciosas (DLPs), las cuales también pueden unirse a los GRs impidiendo ver un efecto de dilución. Se ha reportado la presencia de DLP en muestras de TLP purificados con un gradiente de CsCl, ya que las TLP pueden perder la cápside externa VP4 y VP7 para producir DLP (Ciarlet y Estes, 2002).

Los resultados no permiten determinar si la unión de los virus a los GRs se realiza por el AS de los receptores celulares o por otras moléculas como proteínas presentes en la membrana de los GRs, entre las que se encuentran Hsc70, PDI e integrinas (Prado *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014; Handin *et al.*, 2003) proteínas reportadas como de unión del rotavirus.

Estudios realizados con adenovirus tipo 5 (Ad5) muestran que la unión a los glóbulos rojos se realiza a través del receptor CAR y que esta unión es un mecanismo de secuestro que protege contra la infección sistémica, evitando a su vez la infección de las células, lo que obstaculiza el uso de este virus en la terapia génica (Carlisle *et al.*, 2009).

Dado que los aislamientos rotavirales se unen a los glóbulos rojos con porcentajes entre el 30 y el 50 %, se quiso evaluar si dicha unión afecta la infectividad del rotavirus en líneas tumorales REH Y MCF-7. Para ello los rotavirus se incubaron con los glóbulos rojos en las condiciones ya descritas, se realizó un lavado de las partículas virales no unidas a los glóbulos rojos, esta mezcla fue adicionada a las células tumorales por 12 h a 37°C, se lisaron los glóbulos rojos, y para evitar falsos positivos, por la per oxidasa endógena, se evaluó la infección por inmunocitoquímica revelando con Fosfatasa alcalina (Figura 4-3A). Se usaron como control células tumorales infectadas directamente con los aislamientos, sin GRs, Los resultados muestran que si hay infección de las células tumorales, lo que sugiere que los aislamientos rotavirales pueden liberarse de los glóbulos rojos y unirse a los receptores de membrana de las células tumorales. Sin embargo cuando se compara el porcentaje de infección de las partículas virales unidas a los glóbulos rojos, con el porcentaje de las células infectadas directamente con el virus (MOI 1.8) se observa que la infección es menor. Esto puede ser el resultado de una pérdida de partículas virales en el proceso de lavado o que la unión del virus al GR se realiza de forma tal que impide al rotavirus estar en contacto con los receptores de las células. Intentando evaluar esta apreciación, se realizó otro ensayo con células MCF-7, consistente en dejar fija la cantidad de virus (MOI 1,8) y diluir la cantidad de GRs, (1:10 hasta 1:128); los resultados obtenidos mostraron que hay una mayor infección de las células tumorales cuando la concentración de GRs es menor, sugiriendo que una mayor cantidad de partículas rotavirales se unen a cada GR, unión que sería inestable y que facilitaría el desprendimiento del virus, permitiendo la unión y el posterior ingreso a la célula tumoral.

Se conoce que la infección por rotavirus inhibe la síntesis de proteínas celulares, es por eso que la expresión de proteínas celulares puede ser usada para monitorear la infección y patogenia viral. Vectores virales que contiene la proteína verde fluorescente (GFP) han sido usados en células como marcadores que permitan este monitoreo. La evaluación de la expresión de la proteína GFP en células SP2/O-Ag114 y REH transfectadas con el vector lentoviral para esta proteína, permitió determinar si los virus unidos a los GRs infectaban las células tumorales. Para ello se adicionaron glóbulos rojos-virus, en diferentes MOI, a las líneas tumorales SP2/O-Ag114 y REH que expresaran la proteína verde fluorescente. La infección fue evaluada con inmunocitoquímica. Los resultados de este ensayo mostraron una disminución de la expresión de la GFP en células infectadas

con rotavirus, comparadas con las células sin infectar. Al comparar la infección de las células infectadas con el GR-virus y las infectadas con el virus solo, se observó una disminución en la expresión de la GFP similar. Los resultados confirman la infección de los virus unidos a los glóbulos rojos. Lo que sugiere que el virus infecta la célula e interfiere con la síntesis de la proteína recombinante GFP, proteína que puede usarse como reportera de la entrada e inhibición de proteínas por parte del rotavirus.

La unión de los aislamientos rotavirales a los glóbulos rojos se puede realizar a través de los azúcares de los oligosacáridos presentes en la membrana celular. Sin embargo, esta unión no impidió que el rotavirus infectará las células tumorales, sugiriendo que la unión a las glicoproteínas o glucolípidos de la membrana no afecta la liberación del rotavirus, para infectar la célula tumoral. Igualmente, implica que la afinidad del rotavirus por los receptores de las células tumorales es mayor que la presentada entre los rotavirus y los azúcares de las glicoproteínas del glóbulo rojo. Sugiere que al entrar en contacto el rotavirus puede soltarse del glóbulo rojo e infectar, gracias a estas diferencias de afinidades. Para corroborar esto, cada uno de los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WWM, Wt1-5, O-ECwt activados previamente con tripsina se incubaron durante una hora a 37°C, con suero fetal bovino (SFB) al 10%, rico en glicoproteínas; o con glicoforina A comercial (20 µg/ml en un volumen total de 50 µls) o con membranas citoplasmáticas enriquecidas de glóbulos rojos. Esta mezcla fue adicionada a las células tumorales y se evaluó la infección con inmunofluorescencia. Al comparar la infección de las células infectadas con el virus solo respecto a los rotavirus incubados con los reactivos mencionados, los resultados obtenidos se caracterizan por no ser homogéneos y estar relacionados con el tipo de aislamiento rotaviral. Los virus WTEW, TRUY, WWM Y Wt1-5 incubados con las fracciones de membrana y el SFB aumentan el porcentaje de infección y con O-ECwt disminuye. Los virus WWM y WT1-5, O-ECwt incubados con glicoforina A, aumentaron el porcentaje de infección y la infección fue menor con los aislamientos WTEW y TRUY. Estos resultados sugieren que la unión de los rotavirus a los azúcares de la glicoproteínas solubles no interfieren con el proceso infeccioso y que para algunos casos, los rotavirus lo utilizan como transportador o “carrier”, explicando el aumento en la infección. Esto ha sido reportado para albúmina, una glicoproteína, cuando se utiliza como control (Guerrero *et al.*,2000).

Un requisito para el uso de virus oncolíticos es que presenten tropismo por las células tumorales pero no por el tejido normal. Trabajos previos realizados en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina determinaron que los aislamientos rotavirales WTEW, TRUY, WMW, Wt1-5, O-Ecwt no infectan células normales *in vitro*.(2). Para establecer si el aislamiento rotaviral O-ECwt infecta tejido normal *in vivo*, se inocularon TLPs del virus O-ECwt vía endovenosa en la cola de dos ratones adultos. Se realizaron cortes histológicos a los cuales se les determinó mediante inmunofluorescencia la presencia de antígenos rotavirales. Los tejidos evaluados fueron: sangre periférica, hígado, pulmón, bazo, corazón, riñón y cerebro, que son los órganos con mayor probabilidad de retener rotavirus. El resultado de la inmunofluorescencia en todos los casos fue negativo. Esto sugiere que en el momento de ser inyectado el virus, el sistema inmune logró neutralizar los rotavirus o el virus fue secuestrado por otros órganos como por ejemplo el hígado y allí son destruidos los rotavirus (Wong *et al.*, 2010; Chiocca y Rabkin, 2014). Se ha reportado que cuando las células no poseen los receptores, éstos son endocitados y destruidos en el lisosoma (Fukuhara *et al.*, 1989). Como el tejido normal no presenta los receptores para el virus, que si se expresan en las líneas tumorales, este no logró ingresar a las células de manera infecciosa y por esto no se presentó infección en los órganos estudiados.

## 6. CONCLUSIONES

Este es un trabajo novedoso, no reportado en la literatura, cuyo objetivo fundamental era determinar si los aislamientos tenían capacidad hemaglutinante y si la unión al GR impedía la infección a la célula tumoral. De presentarse hemaglutinación, se corre el riesgo de producir trombos al aplicarlo vía endovenosa y ser “secuestrados” e impedir su llegada al tumor. Concluimos que:

1. Los aislamientos rotavirales no tienen capacidad hemaglutinante, aunque TRUY y WTEW presentaron ligera hemaglutinación con las mayores concentraciones. Este efecto habrá que tenerse en cuenta en los estudios *in vivo*, para determinar si impiden su uso o no, como virus oncolítico.
2. La unión de los rotavirus estudiados a las azúcares de los glóbulos rojos no impide su unión e infección a las células tumorales. Especulamos que la afinidad de los rotavirus por los receptores celulares en las células tumorales es mayor que la presentada por los azúcares de los glóbulos rojos.

## 7. RECOMENDACIONES

Secuenciar los genomas de los aislamientos rotavirales para establecer el origen de la VP4 de los aislamientos rotavirales.

Evaluar la infección de los aislamientos rotavirales en tejido tumoral *in vivo*, inyectando vía endovenosa virus adheridos a glóbulos rojos o a glicoforina, a animales que presenten tumores.

## BIBLIOGRAFIA

- Acosta, O., Moreno, L. P., & Guerrero, C. A. (2009). Un modelo del mecanismo de entrada de los rotavirus a la célula hospedera. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional.*, 24-148.
- Afrikanova, I., Fabbretti, E., Miozzo, M., & Burrone, O. (1998). Rotavirus NSP5 phosphorylation is up-regulated by interaction with NSP2. *Journal of Virology*, 2679-2686 .
- Afrikanova, I., Miozzo, M., Giambiagi, S., & Burrone, O. (1996). Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5. *Journal of General Virology*, 2059-2065.
- An, X., & Mohandas, N. (2008). Disorders of red cell membrane. *British Journal of Haematology* , 367-375.
- Arias, C., et al. (2001). Early events of rotavirus infection: the search for the receptor(s). *Novartis Foundation symposium*, 47-60.
- Arias, C., Romero, P., Alvarez, V., & Lopez, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology*, 5832-5839.
- Arnoldi, F., Campagna, M., Eichwald, C., Desselberger, U., & Burrone, O. (2007). Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2. *Journal of Virology*, 2128-2137.
- Au, K., Chan, W., Burns, J., & Estes, M. (1989). Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28. *Journal fo Virology*, 4553-4562.
- Ball, J., Tian, P., Zeng, C., Morris, A., & Estes, M. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*, 101-104.
- Banda, K., Kang, G., & Varki, A. (2009). 'Sialidase sensitivity' of rotaviruses revisited. *Nature Chemical Biology* , 71 - 72.
- Barber, G. (2004). Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunology*, 516-527.
- Barro, M., & Patton, J. (2007). Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *Jornal of Virology*, 4473-4481.
- Bergmann, C., Maass, D., Poruchynsky, M., Atkinson, P., & Bellamy, A. (1989). Topology of the non-structural rotavirus receptor glycoprotein NS28 in the rough endoplasmic reticulum. . *The Embo Journal*, 1695-1703.

- Berois, M., Sapin, C., Erk, I., Poncet, D., & Cohen, J. (2003). Rotavirus nonstructural protein NSP5 interacts with major core protein VP2. *Journal of Virology*, 1757-1763.
- Blackhall, J., Munoz, M., Fuentes, A., & Magnusson, G. (1998). Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. *Journal of Virology*, 6398-6405.
- Calderon, M., Guerrero, C., Acosta, O., S., L., & Guerrero, C. (2012). Inhibiting Rotavirus Infection by Membrane-Impermeant Thiol/Disulfide Exchange Blockers and Antibodies against Protein Disulfide Isomerase Protein disulfide isomerase. *Intervirology*, 451-464.
- Campagna, M., Eichwald, C., Vascotto, F., & Burrone, O. (2005). RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. *Journal of General Virology*, 1481-1487.
- Cancer, I. N. (12 de 10 de 2014). *Instituto Nacional del Cancer*. Obtenido de Instituto Nacional del Cancer: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
- Carlisle, R., et al. (2009). Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1. *Blood*, 1909-1918.
- Cattaneo, R., Miest, T., Shashkova, E., & Barry, M. (2008). Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nature Reviews Microbiology*, 529-540.
- Chaibi, C., et al. (2005). Rotavirus induces apoptosis in fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Virology*, 480-490.
- Chiocca, A., & Rabkin, S. (2014). Oncolytic Viruses and Their Application to Cancer. *Cancer Immunology Research*, 295-300.
- Ciarlet, M., et al. (2002). VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *Journal of Virology*, 1109-1123.
- Ciarlet, M., & Estes, M. (1999). Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *Journal of General Virology*, 943-948.
- Ciarlet, M., & Estes, M. (2002). Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies. En B. G., *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (págs. 2753–2773). New York, USA : John Wiley & Sons,.
- Ciarlet, M., Ludert, J., Iturriza-Gómara, M., Liprandi, F., Gray, J., Desselberger, U., & Estes, M. (2002). Initial interaction of rotavirus strains with N-acetylneuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *Journal of Virology*, 4087-4095.

- Ciocca, D., & Calderwood, S. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*, 86–103.
- Coulson, B., Londrigan, S., & Lee, D. (1997). Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 5389-5394.
- Daniels, G. (2007). Functions of red cell surface proteins. *Vox Sanguinis*, 331-340.
- Delorme, C., Brussow, H., Sidoti, J., Roche, N., Karlsson, K., Neeser, J., & Teneberg, S. (2001). Glycosphingolipid binding specificities of rotavirus: identification of a sialic acid-binding epitope. *Journal of Virology*, 2276–2287.
- Estes, M., & Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. . *Microbiological Reviews*, 410-449.
- Fauvel, M., Spence, L., Babiuk, L., Petro, R., & Bloch, S. (1978). Hemagglutination and hemagglutination-inhibition studies with a strain of Nebraska calf diarrhea virus (bovine rotavirus). *Intervirology*, 95-105.
- Ferguson, M., Lemoine, N., & Wang, Y. (2012). Systemic Delivery of Oncolytic Viruses: Hopes and Hurdles. *Advances in Virology*.
- Fukuhara, N., Yoshie, I., Kitaoka, S., Konno, T., & Ishida, N. (1987). Evidence for endocytosis-independent infection. *Archives of Virology*, 93-99.
- Fukuhara, N., Nishikawa, K., Gorziglia, M., & Kapikian, A. (1989). Nucleotide sequence of gene segment 1 of a porcine rotavirus strain. *Virology* , 743-749.
- Gallegos, C., & Patton, J. (1989). Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. *Virology*, 616-627.
- Gallina, A., & al., e. (2002). Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. . *The Journal of Biological Chemistry*, 50579-50588.
- Garber, K. (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute* , 298–300.
- Garrido, A., & Teijon, J. (2006). *Fundamentos de bioquímica metabólica*. Madrid: TÉBAR.
- Giammarioli, A. M., Mackow, E., Fiore, L., Greenberg, H., & Ruggeri, F. (1996). Production and characterization of murine IgA monoclonal antibodies to the surface antigens of rhesus rotavirus. . *Virology*, 97–110.
- Gonzalez, S. B. (1991). Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine. *Virology* , 8-16.

- Gonzalez-Ochoa, G., & al., e. (2013). Mutation distribution in the NSP4 protein in rotaviruses isolated from Mexican children with moderate to severe gastroenteritis. *Viruses*, 792-805.
- Graff, J., Ewen, J., Ettayebi, K., & Hardy, M. (2007). Zinc-binding domain of rotavirus NSP1 is required for proteasome-dependent degradation of IRF3 and autoregulatory NSP1 stability. *Journal of General Virology*, 613-620.
- Graham, K., Fleming, F., Halasz, P., Hewish, M., Nagesha, H., & Holmes, I. (2005). Rotaviruses interact with  $\alpha 4\beta 7$  and  $\alpha 4\beta 1$  integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *Journal of General Virology*, 3397-3408.
- Guerrero, C., et al. (2002). Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry. *Journal of Virology*, 4096-4102.
- Guerrero, C., et al. (2000). Integrin alpha (v) beta (3) mediates rotavirus cell entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 14644-14649.
- Guerrero, C., Mendez, E., Zarate, S., Isa, P., López, S., & Arias, C. (2000). Integrin alpha V Beta-3 mediates rotavirus cell entry. *Proceeding National Academic Science* , 14644 – 14649.
- Guerrero, R. (2010). Evaluación del potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de cáncer de mieloma murino sp2/0-ag14. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Laboratorio de Biología Molecular del Virus. Bogotá D.C.
- Guo, C., Nakagomi, O., Mochizuki, M., Ishida, H., Kiso, M., Ohta, Y., Suzuki, Y. (1999). Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *The Journal of Biochemistry*, 683-688.
- Hamrita, B., Nasr, H., Kabbage, M., Trimeche, M., Hamman, P., Guillier, C., Chahed, K. (2010). Proteomic Analysis of Human Breast Cancer: New Technologies and Clinical Applications for Biomarker Profiling. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 091-098.
- Handin, R., Lux, S., & Stossel, T. (2003). *Blood: Principles and Practice of Hematology, Volumen 1*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Obtenido de [http://books.google.com.co/books/about/Blood.html?id=H85dwxYTKLwC&redir\\_esc=y](http://books.google.com.co/books/about/Blood.html?id=H85dwxYTKLwC&redir_esc=y)
- Harduin, A., Vallejo, V., Krzewinski, M., Samyn, B., Julien, S., & Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 727-737.
- Haselhorst, T., Fleming, F., & al., e. (2008). Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasión. *Nature Chemical Biology* , 91 - 93.

- Hecht, J., Bedford, R., Abbruzzese, J., et al. (2003). A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 555–561.
- Hernández, J. (2013). Evaluación de la interacción del rotavirus WTEW con las proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40) en el proceso de entrada a las líneas tumorales U-937 Y Reh. Universidad nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Laboratorio de Biología Molecular del Virus. Bogotá D.C.
- Hu, L., Crawford, S., Hyser, J., & Estes, M. (2012). Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Current Opinion in Virology*, 380–388.
- Hua, J., & Patton, J. (1994). The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *Virology*, 567-576.
- Isa, P., Arias, C., & López, S. (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J.*, 27–37.
- Isa, P., López, S., Segovia, L., & Arias, C. (1997). Functional and structural analysis of the sialic acid-binding domain of rotaviruses. *Journal of Virology*, 6749-6756.
- Jordan, P., & Gibbins, J. (2006). Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal.*, 312-324.
- Juhász, K., Lipp, A., Nimmervoll, B., Sonnleitner, A., Hesse, J., Haselgruebler, T., & Balogi, Z. (2013). The complex function of hsp70 in metastatic cancer. *Cancers (Basel)*, 42-66.
- Kapikian, A., Hoshino, Y., & Chanock, R. (2001). Rotaviruses. *In Fields Virology*, 1787-1833.
- Kelly, E., & Russell, S. (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Molecular Therapy*, 651-659.
- Khuri, F., Nemunaitis, J., Ganly, I., & al., e. (2000). A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine*, 879-885.
- Kraschnefski, M., Bugarcic, A., Fleming, F., Yu, X., von Itzstein, M., Coulson, B., & Blanchard, H. (2009). Effects on sialic acid recognition of amino acid mutations in the carbohydrate-binding cleft of the rotavirus spike protein. *Glycobiology*, 194-200.
- Kuhlenschmidt, T., Hanafin, W., Gelberg, H., & Kuhlenschmidt, M. (1999). Sialic acid dependence and independence of group A rotaviruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 309-317.

- Labbe, M., Charpilienne, A., Crawford, E., Estes, M., & Cohen, J. (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *Journal of Virology*, 2946-2952.
- Lech, P., & Russell, S. (2010). Use of attenuated paramyxoviruses for cancer therapy. *Expert Review of Vaccines*, 1275–1302.
- Lin, P., Selinfreund, R., et al. (1987). Rapid and efficient purification of plasma membrane from cultured cells: characterization of epidermal growth factor binding. *Biochemistry*, 731-736.
- Lopez, S., & Arias, C. (2004). Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends in Microbiology*, 271-278.
- Lopez, S., & Arias, C. (2006). Early steps in rotavirus cell entry. *Current topics in microbiology and immunology* , 39-66.
- López, S., & Arias, C. (2011). Los rotavirus. En E. M. Romero, *Microbios en línea* . UNAM y el Centro de Investigación sobre Fijación del Nitrógeno. Obtenido de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap17/>
- Lopez, S., Arias, C., Bell, J., Strauss, J., & Espejo, R. (1985). Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology*, 11-19.
- Lopez, T., Rojas, M., Ayala-Breton, C., Lopez, S., & Arias, C. (2005). Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. . *Journal of General Virology*, 1609-1617.
- Ludert, J., Mason, B., Angel, J., Tang, B., Hoshino, Y., Feng, N., . . . Greenberg, H. (1998). Identification of mutations in the rotavirus protein VP4 that alter sialic-acid-dependent infection. *Journal of General Virology*, 725–729.
- Lyons, M., & al., e. (2006). Adenovirus Type 5 Interactions with Human Blood. *Molecular Therapy*, 118-128.
- Malykh, Y., Schauer, R., & Shaw, L. (2001). N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie.*, 623-634.
- Markovic, I., & al., e. (2004). Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry. *Blood*, 1586-1594.
- Martínez, M., López, S., Arias, C., & Isa, P. (2013). Gangliosides Have a Functional Role during Rotavirus Cell Entry. *Journal of Virology*, 1115-1122.
- Martuza, R., Malick, A., Markert, J., Ruffner, K., & Coen, D. (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*, 854–856.

- Marylin, P. (1993). Aspectos generales de los rotavirus y de la diarrea que producen. *Revista Biomedica*, 129-140.
- Meerani, S., & Yao, Y. (2010). Oncolytic Viruses in Cancer Therapy. *European Journal of Scientific Research*, 156 -171.
- Méndez, E., Arias, C., & López, S. (1993). Binding to sialic acid is not an essential step for the entry of animal rotavirus to epithelial cells in culture. *Virology*, 5253-5259.
- Méndez, E., Arias, C., & López, S. (1996.). Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *Journal of Virology*, 1218–1222.
- Méndez, E., López, S., Cuadras, M., Romero, P., & Arias, C. (1999). Entry of Rotaviruses Is a Multistep Process. *Virology* , 450±459.
- Mitchell, D., & Both, G. (1990). Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology* , 324-331.
- Mohandas, N., & Gallagher, P. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 3939-3948.
- Moreno L. Y. (2010). Expresión, purificación y caracterización de las proteínas estructurales del rotavirus VP5, VP6 Y VP8. Maestría en bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Muñoz. (1997). *Cáncer. Genes y Nuevas Terapias*. Madrid.
- Paterson, J. M., Lemay, C. G., Falls, T. J., McGuire, A., Parato, K. A., Daneshmand, D. F., . . . Bell, J. C. (2007). Targeted Inflammation During Oncolytic Virus Therapy Severely Compromises Tumor Blood Flow. *Molecular Therapy*, 1686–1693.
- Patton, J., & Chen, D. (1999). RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. *Journal of Virology*, 1382-1391.
- Piron, M., Vende, P., Cohen, J., & Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *The Embo Journal*, 5811-5821.
- Poncet, D., Lindenbaum, P., L'Haridon, R., & Cohen, J. (1997). In vivo and in vitro phosphorylation of rotavirus NSP5 correlates with its localization in viroplasms. *Journal of Virology*, 34-41 .
- Power, A., & Bell, J. (2007). Cell-based delivery of oncolytic viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. *Molecular Therapy* , 660-665.
- Prado, G., Romero, J., & Rivera, A. (2013). Endothelin-1 receptor antagonists regulate cell surface-associated protein disulfide isomerase in sickle cell disease. *The FASEB Journal*, 4619-4629.

- Reddy, . Burroughs, K., Hales, L., Ganesh, S., Jones, B., Idamakanti, N., Hallenbeck, P. (2007). Seneca Valley Virus, a Systemically Deliverable Oncolytic Picornavirus, and the Treatment of Neuroendocrine Cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 1623-1633.
- Rivera, H. (2014). Evaluación de la actividad oxido-reductora de PDI durante la unión PDI-TLPs de rotavirus en la membrana citoplasmática de vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR adulto. Maestría en bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Rojas, M., & López, S. (2008). Biología molecular de rotavirus: una mirada a través de la interferencia de RNA. *Mensaje Bioquímico*, 149-162.
- Rolsma, M., Kuhlenschmidt, T., Gelberg, H., & Kuhlenschmidt, M. (1998). Structure and function of a ganglioside receptor for porcine rotavirus. *Journal of Virology*, 9079 – 9091.
- Román, E. (2005). *Comité Asesor de Vacunas de la AEP (Asociación Española de Pediatría)*. Obtenido de Manual de vacunas en pediatría. Vacunación frente a rotavirus.: [http://vacunasaep.org/manual/Cap8\\_18\\_Rotavirus.pdf](http://vacunasaep.org/manual/Cap8_18_Rotavirus.pdf)
- Rosenberg, A. (1995). *Biology of the Sialic Acids*. New York: Springer Science & Business Media.
- Ruiz, M., Leon, T., & Díaz, Y. (2009). Molecular Biology of Rotavirus Entry and. *TheScientificWorldJOURNAL*, 1476–1497.
- Russell, S., Peng, K., & Bell, J. (2014). Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*, 658-670.
- Santana, A., Guerrero, C., & 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. *Archives of Virology*, 1323-1336.
- Santana, A. (2008). Participación de la proteína de choque térmico Hsc70, la integrina  $\alpha\beta 3$  y la proteína disulfuro isomerasa en el proceso de entrada del rotavirus homólogo ECwt y heterólogos RRV y Wa en cultivos primarios de células intestinales de ratón lactante. Maestría en bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Schauer, R. (2004). Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. . *Zoology* , 49–64.
- Sen, A., Agresti, D., & Mackow, E. (2006). Hyperphosphorylation of the rotavirus NSP5 protein is independent of serine 67, NSP2, or the intrinsic insolubility of NSP5 is regulated by cellular phosphatases. *Journal of Virology*.

- Sharma, S., Punjabi, V., Zingde, S., & Gokhale, S. (2014). A Comparative Protein Profile of Mammalian Erythrocyte Membranes Identified by Mass Spectrometry. *The Journal of Membrane Biology*.
- Shtrichman, R., & Kleinberger, T. (1998). Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells. *Journal of Virology*, 2975–2982.
- Silva, H. (2012). Potencial oncolítico del rotavirus en la línea celular de Linfoma Histocítico U937. Universidad nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Laboratorio de Biología Molecular del Virus. Bogotá D.C.
- Singh, P., Doley, J., Kumar, G., Sahoo, A., & Tiwari, A. (2012). Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. *Indian Journal of Medical Research*, 571-584.
- Southam, C. M., & Moore, A. E. (1952). Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to egypt 101 virus. *Cancer*, 1025–1034.
- Superti, F., Tinari, A., Baldassarri, L., & Donelli, G. (1991). HT-29 cells: a new substrate for rotavirus growth. *Archives of Virology*, 159-173.
- Sze, D., TonyR., Reid, T., & Rose, M. (2013). Oncolytic Virotherapy. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 115–1122.
- Taraporewala, Z., Chen, D., & Patton, J. (1999). Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *Journal of Virology*, 9934-9943.
- Taraporewala, Z., Chen, D., & Patton, J. (2001). Multimers of the bluetongue virus nonstructural protein, NS2, possess nucleotidyl phosphatase activity: similarities between NS2 and rotavirus NSP2. *Virology*, 221-231.
- Thirukkumaran, C., & Morris, G. (2009). Oncolytic viral therapy using reovirus. *Methods in Molecular Biology*, 607–634.
- Tollefson, A., Ryerse, J., Scaria, A., & al., e. (1996). The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology*, 152–162.
- Torres-Vega, M., & al., e. (2000). The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *Journal of General Virology*, 821-830.
- Traving, C., & Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1330-1349.
- Tse, W., & Lux, S. (1999). Red blood cell membrane disorders. *British Journal of Haematology*, 2-13.

- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., & Ferraro, A. (2002). Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *Journal of Cellular Physiology*, 154-163.
- Verheije, M., & Rottier, P. (2012). Retargeting of Viruses to Generate Oncolytic Agents. *Advances in Virology*.
- Widdowson, M., Bresee, J., Gentsch, J., & Glass, R. (2005). Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol*, 26-31.
- Willmon, C., Harrington, K., Kottke, T., Prestwich, R., Melcher, A., & Vile, R. (2009). Cell Carriers for Oncolytic Viruses: Fed Ex for Cancer Therapy. *Molecular Therapy*, 1667–1676.
- Wong, H., Lemoine, N., & Wang, Y. (2010). Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. *Viruses*, 78-106.
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Guerrero, C., Arias, C., & López, S. (2000). Integrin  $\alpha 2\beta 1$  mediates the cell attachment of the rotavirus neuroaminidase- resistant variant . *Virology* , 50-54.
- Zárate, S., Espinosa, S., Romero, P., Méndez, E., Arias, C., & S., L. (2000). The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *Journal of Virology*, 593-599.