



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PPAR $\gamma$  Y NF $\kappa$ B EN  
VELLOSIDADES INTESTINALES DE RATONES ADULTOS ICR INFECTADOS CON  
ROTAVIRUS EC<sub>wt</sub> Y TRATADOS CON PIOGLITAZONA

DORY LINETH GÓMEZ MORENO

Código:05599249

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA

BOGOTÁ D. C.; COLOMBIA

2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PPAR $\gamma$  Y NF $\kappa$ B EN  
VELLOSIDADES INTESTINALES DE RATONES ADULTOS ICR INFECTADOS CON  
ROTAVIRUS EC<sub>wt</sub> Y TRATADOS CON PIOGLITAZONA

DORY LINETH GÓMEZ MORENO

Código:05599249

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

Director:

MD. MSc. PhD. CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA

Grupo de Investigación:

Biología Molecular de virus

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA

BOGOTÁ D. C.; COLOMBIA

2013

A Dios por iluminarme y acompañarme siempre, a mi familia que con sus palabras de aliento, su apoyo y amor incondicional me motivaron a seguir adelante sin importar las dificultades, a mi pequeño amigo Pegasito, te voy a extrañar, a mis amigos por sus innumerables palabras de ánimo y finalmente a mí misma como una forma de demostrarme que el trabajo, la dedicación, la disciplina y el amor pueden hacer realidad todos los sueños.

## **Agradecimientos**

Iniciada esta etapa de mi vida, en donde doy mis primeros pasos en el mundo de la ciencia, quiero agradecer a Dios y la Virgen por su infinita misericordia e iluminación, a mi familia Francisco Gómez, Aura Inés Moreno y Marly Gómez por su apoyo, compañía y paciencia, ellos siempre han sido mi fuente de constante inspiración y mis mejores amigos, al Doctor Carlos Arturo Guerrero por su orientación, sus enseñanzas, su paciencia y su admirable dedicación, más que un profesor es un verdadero maestro no solo a nivel educativo sino a nivel profesional y personal, a mis profesores Doctor Orlando Acosta y Doctor Alberto Gómez por ser partícipes de mi proceso de formación en la maestría, a Miguel Ospino Márquez y a todos mis compañeros de laboratorio y maestría, por su colaboración, aportes y compañía, aprecio su preocupación y apoyo.

## Resumen

### ANTECEDENTES

Rotavirus es la principal causa de diarrea severa en niños menores de cinco años de edad en todo el mundo, según la OMS, rotavirus causa aproximadamente 527.000 muertes cada año (1). Dos vacunas de rotavirus vivos atenuados (Rotarix™) y (RotaTeq™) están disponibles actualmente (2). Aunque estas vacunas han demostrado su eficacia, no evita la aparición de los síntomas y muchos niños permanecen sin vacunar. Por consiguiente, se necesitan alternativas farmacológicas para el tratamiento de niños en los que no se pudo evitar la infección.

Por tanto, se requiere desarrollar más investigación y evaluar medicamentos que interfieran con la infección por rotavirus. Investigaciones anteriores en nuestro laboratorio indicaron que algunos AINES, agonistas de PPAR y antioxidantes tales como NAC y ácido ascórbico, reducen la infección por rotavirus. Sin embargo, sería interesante determinar el tiempo específico de ciclo viral en el que la infección es inhibida por los fármacos probados. Por otro lado, se requiere relacionar los cambios en las proteínas celulares y virales asociados directamente o indirectamente con el tratamiento farmacológico; esto es muy importante para entender los detalles relacionados con las interacciones célula-rotavirus.

**OBJETIVO:** Evaluar la expresión de las proteínas PPAR $\gamma$  y NF $\kappa$ B en un modelo *in vivo* que consiste en analizar las vellosidades intestinales de los ratones ICR adultos infectados con la cepa de rotavirus ECwt y tratados con pioglitazona, y un modelo *in vitro* que consiste en aislar las vellosidades intestinales de ratones y después de infectarlas con ECwt, tratarlas con pioglitazona.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Ratones ICR o vellosidades intestinales aisladas fueron infectadas con ECwt y luego tratadas o no con el agonista PPAR $\gamma$  pioglitazona. Tanto la infección, como la expresión de las proteínas celulares se evaluaron utilizando inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, fluorescencia por microscopía confocal, citometría de flujo, Western blot, ELISA de captura y ELISA directo. En todos los casos, los niveles de expresión de proteína se compararon con sus correspondientes controles no tratados.

**RESULTADOS:** Los datos mostraron que las proteínas celulares PPAR $\gamma$ , NF $\kappa$ B, PDI y Hsc70, y ROS tanto *in vivo* como *in vitro* disminuyeron cuando las vellosidades intestinales de los ratones infectados por rotavirus o vellosidades aisladas infectadas *in vitro* fueron tratadas con pioglitazona. También se encontró que el nivel de antígenos de rotavirus estructurales disminuyó tanto *in vivo* como *in vitro* después del tratamiento con pioglitazona.

**CONCLUSIÓN:** Se propone que la activación de PPAR $\gamma$  con su agonista pioglitazona conduce a la activación o inhibición de las vías o factores que a su vez inhiben las vías requeridas por proceso infeccioso de rotavirus, tales como NF $\kappa$ B-Cox-2-ROS, lo que resulta en la reducción de la infección viral.

**PALABRAS CLAVE:** Rotavirus ECwt; pioglitazona; ratones adultos ICR; NF $\kappa$ B; PPAR $\gamma$ ; vellosidades intestinales.

## Abstract

### BACKGROUND

Rotavirus is the leading cause of severe diarrhea in children under five years of age worldwide. According to the WHO, rotaviruses cause approximately 527,000 deaths each year (1). Two live attenuated rotavirus vaccines (Rotarix™) and (RotaTeq™) are currently available (2). Although these vaccines have shown efficacy, symptoms are not completely prevented in some cases, and many children remain unvaccinated. Therefore, pharmacological alternatives are needed for treatment of children in whom infection could not be prevented.

Therefore, further research is needed in order to develop and assess drugs that interfere with rotavirus infection. Previous research in our laboratory indicated that some NSAIDs, PPAR agonists and antioxidants such as NAC and ascorbic acid, reduce rotavirus infection. However, it would be interesting to determine the specific time of viral cycle at which infection is inhibited by the drugs tested. On the other hand, gaining insight into the cellular and viral protein changes directly or indirectly associated with the drug treatment would be very important to understand the details related with rotavirus-cell interactions.

**OBJECTIVE:** To evaluate the expression of PPAR $\gamma$  and NF $\kappa$ B proteins in both an *in vivo* model system consisting of intestinal villi from ICR adult mice infected with the rotavirus strain ECwt and treated with pioglitazone, and a *in vitro* model system consisting of intestinal villi isolated from mice and then infected with ECwt and treated with pioglitazone.

**MATERIALS AND METHODS:** Either mice or intestinal villi isolated from ICR mice were infected with ECwt and then treated or not with the PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone. Both infection and expression of cellular proteins were assessed using immunocytochemistry, immunofluorescence, immunohistochemistry, confocal fluorescence, flow cytometry, Western blot, ELISA capture and direct ELISA. In all cases, protein expression levels were compared to their corresponding untreated controls.

**RESULTS:** The data showed that the cellular proteins PPAR $\gamma$ , NF $\kappa$ B, PDI and Hsc70, and ROS in both *in vivo* and *in vitro* model systems decreased when small intestinal villi from rotavirus-infected mice or isolated villi infected *in vitro* were treated with pioglitazone. It was also found that the level of structural rotavirus antigens decreased after *in vivo* or *in vitro* treatment with pioglitazone.

**CONCLUSION:** It is proposed that the activation of PPAR $\gamma$  with the agonist pioglitazone leads to activation or inhibition of pathways or factors that in turn inhibit pathways required by rotavirus infection process such as NF $\kappa$ B-Cox-2-ROS, resulting in the reduction of viral infection.

**KEYWORDS:** Rotavirus ECWT; pioglitazone; ICR adult mice; NF $\kappa$ B; PPAR $\gamma$ ; intestinal villi.

## Contenido

	<b>Pág.</b>
Resumen	5
Abstract	6
Lista de figuras	10
Lista de tablas	11
Lista de anexos	13
Introducción	15
1. Rotavirus	16
1.1. Características generales de rotavirus	16
1.2. Proteínas estructurales y no estructurales	16
1.3. Ciclo replicativo de rotavirus	17
2. Proteínas celulares y EROs	19
2.1. Proteína de choque térmico de 70 kilodalton (Hsc70)	19
2.2. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)	19
2.3. Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ) y Pioglitazona	20
2.4. Factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B)	21
2.5. Ciclooxygenasa-2 (Cox-2)	22
2.6. Especies reactivas de oxígeno (EROs o ROS)	23
3. Planeación general	24
3.1. Problema	24
3.2. Antecedentes	24
3.3. Justificación	24
3.4. Objetivos	25
3.4.1. Objetivo general	25
3.4.2. Objetivos específicos	25
3.5. Hipótesis	25
4. Materiales y Métodos	26
4.1. Animales, virus y reactivos	26

4.2. Aislamiento de las vellosidades intestinales	27
4.3. Diseño metodológico	27
4.4. Inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y confocal	29
4.5. ELISA de captura y directo	31
4.6. Detección de las especies reactivas de oxígeno	32
4.7. Western Blot	32
4.8. Citometría de flujo	33
4.9. Viabilidad de vellosidades	33
4.10. Reinfeción	33
4.11 . Análisis estadístico	34
5. Resultados	35
5.1. En las vellosidades procedentes de ratones infectados <i>in vivo</i> o en vellosidades aisladas del intestino delgado, infectadas <i>in vitro</i> , se disminuye la infección del rotavirus ECwt al tratarlos con pioglitazona	35
5.2. En las vellosidades procedentes de ratones infectados <i>in vivo</i> o en las vellosidades aisladas del intestino delgado e infectadas <i>in vitro</i> , se aumenta la expresión de PPAR $\gamma$ con la infección del rotavirus ECwt y al tratarlos con pioglitazona se normaliza	42
5.3. PPAR $\gamma$ colocaliza aleatoriamente con los antígenos de rotavirus en vellosidades intestinales de ratones ICR infectadas con rotavirus y tratadas con pioglitazona	47
5.4. La expresión de NF $\kappa$ B o NF $\kappa$ B-p disminuye en vellosidades intestinales aisladas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	49
5.5. NF $\kappa$ B o NF $\kappa$ B-p colocaliza aleatoriamente con los antígenos de rotavirus en vellosidades intestinales de ratones ICR infectadas con rotavirus y tratadas con pioglitazona	53
5.6. La expresión de I $\kappa$ B cambia en las vellosidades intestinales extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona (modelo <i>in vivo</i> )	55
5.7. La expresión de Cox-2 cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	58
5.8. La producción de especies reactivas de oxígeno varía en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	62
5.9. La expresión de PDI cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	65



5.10. La expresión de Hsc70 cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	71
5.11. Se puede inhibir la infección en vellosidades aisladas, si se infecta con rotavirus <i>in vivo</i> y luego de 48 h.p.i. se extraen las vellosidades y se tratan <i>in vitro</i> con pioglitazona	77
5.12. Al activar PPAR $\gamma$ con pioglitazona se disminuye la infección probablemente porque disminuye la cantidad de viriones formados.	81
6. Discusión	82
7. Conclusiones	86
8. Recomendaciones	86
Bibliografía	87

## Lista de figuras

	<b>Págs.</b>
<b>Figura 1-1:</b> Ubicación de las proteínas estructurales en la partícula viral	17
<b>Figura 1-2:</b> Esquema del ciclo replicativo viral	18
<b>Figura 2-3:</b> Vía de señalización de NFκB y su relación con PPARγ	22
<b>Figura 4-4:</b> Modelo <i>in vivo</i>	28
<b>Figura 4-5:</b> Modelo <i>in vitro</i>	28
<b>Figura 4-6:</b> Modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	29
<b>Figura 5-7:</b> En las vellosidades procedentes de ratones infectados <i>in vivo</i> o en las vellosidades aisladas del intestino delgado, infectadas <i>in vitro</i> , se disminuye la infección del rotavirus ECwt al tratarlos con pioglitazona.	40
<b>Figura 5-8:</b> En las vellosidades procedentes de ratones infectados <i>in vivo</i> o en las vellosidades aisladas del intestino delgado, infectadas <i>in vitro</i> , se aumenta la expresión de PPARγ con la infección del rotavirus ECwt y al tratarlos con pioglitazona se normaliza.	46
<b>Figura 5-9:</b> PPARγ colocaliza aleatoriamente con los antígenos de rotavirus en vellosidades intestinales de ratones ICR infectadas con rotavirus y tratadas con pioglitazona.	48
<b>Figura 5-10:</b> La expresión de NFκB o NFκB-p disminuye en vellosidades intestinales aisladas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el sistema <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	52
<b>Figura 5-11:</b> NFκB o NFκB-p colocaliza aleatoriamente con los antígenos de rotavirus en vellosidades intestinales de ratones ICR infectadas con rotavirus y tratadas con pioglitazona	54
<b>Figura 5-12:</b> La expresión de IκB cambia en las vellosidades intestinales extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona (modelo <i>in vivo</i> )	57
<b>Figura 5-13:</b> La expresión de Cox-2 cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	60
<b>Figura 5-14:</b> La producción de especies reactivas de oxígeno puede variar en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	64
<b>Figura 5-15:</b> La expresión de PDI cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	69
<b>Figura 5-16:</b> La expresión de Hsc70 cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	75
<b>Figura 5-17:</b> Se puede inhibir la infección en vellosidades aisladas, si se infecta con rotavirus <i>in vivo</i> y luego de 48 h.p.i. se extraen las vellosidades y se tratan <i>in vitro</i> con pioglitazona.	80
<b>Figura 5-18:</b> Al activar PPARγ con pioglitazona se disminuye la infección probablemente porque disminuye la cantidad de viriones formados.	81

## Lista de tablas

	<b>Págs.</b>
<b>Tabla 4-1:</b> Diluciones del lisado celular en las diferentes horas pos-infección (h.p.i.)	34
<b>Tabla 5-2:</b> Modelo <i>in vivo</i> : porcentajes de infección de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales mediante inmunocitoquímica	35
<b>Tabla 5-3:</b> Modelo <i>in vivo</i> : porcentajes de infección de antígenos virales de proteínas no estructurales NSP4 y NSP5 de Rotavirus evaluadas mediante inmunocitoquímica.	36
<b>Tabla 5-4:</b> Ensayo ELISA modelo <i>in vivo</i> : absorbancia de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales.	37
<b>Tabla 5-5:</b> Inmunocitoquímica del modelo <i>in vitro</i> : porcentajes de infección de antígenos virales de proteínas estructurales y no estructurales NSP4 y NSP5 de Rotavirus	38
<b>Tabla 5-6:</b> ELISA en el modelo <i>in vitro</i> : absorbancia de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales	40
<b>Tabla 5-7:</b> Porcentajes de células positivas para PPAR $\gamma$ inmunofluorescencia modelo <i>in vivo</i>	43
<b>Tabla 5-8:</b> ELISA en el modelo <i>in vivo</i> : absorbancia de la proteína PPAR $\gamma$	43
<b>Tabla 5-9:</b> Porcentajes de células positivas para PPAR $\gamma$ inmunofluorescencia modelo <i>in vitro</i>	44
<b>Tabla 5-10:</b> ELISA de modelo <i>in vitro</i> : absorbancia de la proteína PPAR $\gamma$	45
<b>Tabla 5-11:</b> Inmunofluorescencia del modelo <i>in vivo</i> del porcentajes de células positivas para NF $\kappa$ B	50
<b>Tabla 5-12:</b> Inmunofluorescencia del modelo <i>in vitro</i> del porcentajes de de células positivas para NF $\kappa$ B	51
<b>Tabla 5-13:</b> ELISA del modelo <i>in vivo</i> : absorbancia de la proteína I $\kappa$ B	56
<b>Tabla 5-14:</b> Inmunofluorescencia del modelo <i>in vivo</i> de porcentaje de células positivas para Cox-2	58
<b>Tabla 5-15:</b> Inmunofluorescencia modelo <i>in vitro</i> del porcentaje de células positivas para Cox-2	60
<b>Tabla 5-16:</b> Porcentajes de células positivas para ROS modelo <i>in vivo</i>	62
<b>Tabla 5-17:</b> Porcentajes de células positivas para ROS modelo <i>in vitro</i>	63
<b>Tabla 5-18:</b> Inmunofluorescencia del modelo <i>in vivo</i> : porcentaje de células positivas para PDI	65
<b>Tabla 5-19:</b> ELISA en modelo <i>in vivo</i> , absorbancia de la proteína PDI	66
<b>Tabla 5-20:</b> Inmunofluorescencia modelo <i>in vitro</i> : porcentajes de células positivas para PDI	67
<b>Tabla 5-21:</b> ELISA del modelo <i>in vitro</i> : absorbancia de la proteína PDI.	68

<b>Tabla 5-22:</b> Porcentajes de células positivas para Hsc70 inmunofluorescencia modelo <i>in vivo</i>	71
<b>Tabla 5-23:</b> ELISA del modelo <i>in vivo</i> : absorbancia de la proteína Hsc70	72
<b>Tabla 5-24:</b> Inmunofluorescencia del modelo <i>in vitro</i> : porcentajes de células positivas para Hsc70	73
<b>Tabla 5-25:</b> Absorbancia de la proteína Hsc70 modelo <i>in vitro</i> , ensayo ELISA	74

## Lista de anexos

	<b>Págs.</b>
<b>Anexo A:</b> Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo <i>in vivo</i> ). Fotografías representativas de cada grupo.	93
<b>Anexo B:</b> Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona <i>in vitro</i> (Modelo <i>in vitro</i> ). Fotografías representativas de cada grupo.	94
<b>Anexo C:</b> Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de PPAR $\gamma$ en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo <i>in vivo</i> ). Fotografías representativas de cada grupo.	95
<b>Anexo D:</b> Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de PPAR $\gamma$ en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona <i>in vitro</i> (Modelo <i>in vitro</i> ). Fotografías representativas de cada grupo.	96
<b>Anexo E:</b> Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular PPAR $\gamma$ .	97
<b>Anexo F:</b> Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal de vellosidades aisladas para la detección y localización de PPAR $\gamma$ .	98
<b>Anexo G:</b> Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de NF $\kappa$ B en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo <i>in vivo</i> ). Fotografías representativas de cada grupo.	99
<b>Anexo H:</b> Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de NF $\kappa$ B en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona <i>in vitro</i> (Modelo <i>in vitro</i> ). Fotografías representativas de cada grupo.	100
<b>Anexo I:</b> Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular NF $\kappa$ B-p.	101
<b>Anexo J:</b> Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal de vellosidades aisladas para la detección y localización de NF $\kappa$ B	102
<b>Anexo K:</b> Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular I $\kappa$ B.	103
<b>Anexo L:</b> Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de Cox-2 en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo <i>in vivo</i> ). Fotografías representativas de cada grupo.	104
<b>Anexo M:</b> Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular Cox-2.	105

**Anexo N:** Fotografías representativas de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS u EROs) en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona; modelo *in vivo*, utilizando el kit Cellomics® Oxidative Stress I. 106

**Anexo O:** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de PDI en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo. 107

**Anexo P:** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular PDI. 108

**Anexo Q:** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de Hsc70 en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo. 109

**Anexo R:** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular Hsc70. 110

**Anexo S:** Fotografías representativas de las vellosidades extraídas con disgregación parcial. (Tomadas por microscopía confocal). 111

## Introducción

El rotavirus es la principal causa de diarrea severa en niños menores de cinco años en todo el mundo, según la OMS se estima que aproximadamente 527.000 niños mueren cada año por esta causa(1); anualmente este virus causa 111 millones de episodios de gastroenteritis que requieren cuidados en casa, más de 25 millones de consultas médicas y dos millones de hospitalizaciones; se ha observado que los fallecimientos ocurren especialmente en países en desarrollo(2). En Colombia, estudios realizados entre 1979 a 2003 pudieron establecer que rotavirus presenta una variación biestacional entre los primeros meses del año (febrero y mayo) y los últimos meses (septiembre y noviembre); siendo las edades más afectadas los niños entre 6 a 23 meses de edad, los cuales presentaban factores de riesgo asociados a la deshidratación como: bajo peso al nacer, vivir en comunidad, lactancia materna menor a tres meses, alimentos contaminados y no lavarse las manos después de ir al baño(3-4).

Se han desarrollado dos vacunas de virus vivos atenuados, en una se utiliza la cepa de rotavirus humano (Rotarix™) y en otra un recombinante pentavalente humana-bovina (Rotateq™)(5). Sin embargo, aun no se conocen completamente los mecanismos de protección de las vacunas de rotavirus. Adicionalmente, las vacunas disminuyen la intensidad de los síntomas pero no evitan que se presenten.

Además, muchos niños no reciben la vacuna especialmente en países en desarrollo y hasta un 35% de los niños en países latinoamericanos presentarán episodios de diarrea a pesar de haber recibido la vacuna, algunos casos con diarrea severa requirieron hospitalización(6-7). Por lo tanto, se requiere tener alternativas para el manejo de la infección en los sujetos en quienes no se puede prevenir la contaminación o la intensidad de los síntomas no desaparecen a pesar de estar vacunados. Por esta razón se presenta como alternativa de manejo el uso de medicamentos antioxidantes.

Trabajos previos en nuestro laboratorio indican que al interferir la reacción de oxido-reducción (redox) en la célula, con fármacos como N-acetilcisteína (NAC), ácido ascórbico, Ditiotreitól (DTT), Bacitracin o Reactivo de Ellman 5',5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) interfieren con la infección de rotavirus(8-9). Igualmente, al aplicar fármacos como AINES (antiinflamatorios no esteroideos) y agonistas de PPAR $\gamma$  se reduce la infección *in vitro* en líneas celulares (10) y en vellosidades aisladas de intestino de ratón e *in vivo* en ratón infectado con rotavirus silvestre ECwt(8). En la actualidad el laboratorio está trabajando en determinar los mecanismos por medio de los cuales los diferentes fármacos interfieren con el proceso infeccioso, específicamente si la acción es sobre la célula, directamente sobre el virus o ambos. Igualmente se está precisando a partir de qué momento de la infección los diferentes fármacos son efectivos en interferir con el proceso infeccioso. Este trabajo intenta precisar, en modelo *in vitro* e *in vivo*, a partir de qué momento de la infección al activar el PPAR $\gamma$ , con el agonista pioglitazona, se afecta el proceso infeccioso. Adicionalmente se intenta determinar los cambios en algunas proteínas celulares que se sabe están relacionadas directa o indirectamente con el fármaco o con la infección de rotavirus.

# 1. Rotavirus

## 1.1. Características generales de rotavirus

Rotavirus es un virus perteneciente a la familia *Reoviridae*; una familia de virus icosaédricos sin envoltura (desnudos); en su cápside se encuentran tres capas: capa externa, media e interna. Mide aproximadamente 76.5 nm de diámetro, su genoma está compuesto de 11 segmentos de ARN de doble-hebra, que codifican seis proteínas estructurales denominadas VP (VP 1 a 6) y seis no estructurales (uno de sus segmentos codifica para 2 proteínas) llamadas NSP (NSP1 a 6)(11-13).

Se han descrito siete grupos de rotavirus (de A a G), pero solo los grupos A, B y C infectan a los humanos; este virus es estable en el medio ambiente, es infeccioso hasta por una semana, en condiciones relativamente secas o por diez días cuando permanece sobre superficies no porosas en humedad relativa media y baja. A temperaturas más bajas y con mayor humedad la infectividad persiste por cuarenta y cinco días(11).

## 1.2. Proteínas estructurales y no estructurales

El virión maduro está compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral, el cual consta de once segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). La capa más interna del virión está formada por 60 dímeros de la proteína VP2, que rodea al genoma del virión y de pequeñas cantidades de la RNA polimerasa VP1 y de la guanilil-transferasa VP3. Doscientos sesenta trímeros de VP6, la proteína más abundante del virión, constituyen la capa intermedia. La capa más externa está formada por dos proteínas, VP4 y VP7. La superficie lisa del virus está compuesta por 780 copias de la glicoproteína VP7, organizada en forma de trímeros, mientras que 60 espículas, formadas por VP4, se proyectan hacia el exterior de la superficie viral(13). La proteína VP4 tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración a la célula que infecta; por lo tanto, las propiedades de esta proteína son determinantes importantes del rango de huésped, virulencia, tropismo, e inducción de inmunidad protectora(13). El papel de VP7 durante las primeras interacciones del virus con la célula no es muy claro, aunque se ha demostrado que esta proteína interacciona con la superficie celular en eventos posteriores a la unión inicial(14).

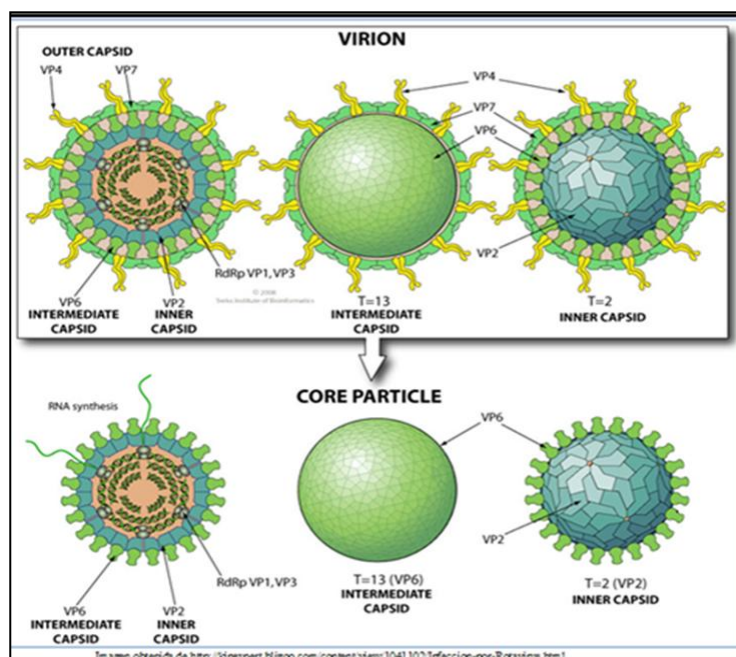
Además de las proteínas estructurales, se han identificado seis proteínas no estructurales (NSP1-6). NSP1 es transcrita por el gen 5 y es una proteína no estructural de unión a ARN. NSP2 es una proteína de unión a ARN, que se acumula en inclusiones citoplasmáticas (viroplasma) y es necesaria en la replicación del genoma, NSP3 está unida a ARNm en las células infectadas y es la responsable de la finalización de la síntesis proteica celular, NSP4 es una enterotoxina viral que induce diarrea y fue la primera enterotoxina viral que se descubrió, NSP5 está codificada por el segmento 11 del genoma vírico del rotavirus A, y en las células infectadas se acumula en el viroplasma, NSP6 es una proteína de unión a ácido nucleico es codificada por el gen 11, en un marco abierto de lectura desfasado(15).



### 1.3. Ciclo replicativo de rotavirus

Después de unirse a la superficie de la célula, el virus penetra la membrana plasmática y esta penetración se incrementa al tratar el virus con tripsina, que corta la proteína VP4 en dos polipéptidos llamados VP8 y VP5, (Figura 1-1)(16). Los rotavirus tienen un tropismo muy específico infectando las puntas de las vellosidades del intestino delgado, sugiriendo que existen receptores específicos que permiten su entrada a la célula hospedera. In vitro, también muestran un tropismo restringido ya que se unen a la superficie de una gran variedad de líneas celulares, infectando eficientemente a células derivadas de epitelio renal o intestinal(17-18). Aparentemente, la entrada a la célula huésped es un proceso que se lleva a cabo en varios pasos, involucrando diferentes dominios de las proteínas de superficie del virus, así como varios receptores celulares como las integrinas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha x\beta 2$ ,  $\alpha v\beta 3$  y a la proteína Hsc70(17) y PDI(9). Además de estas proteínas, las investigaciones han concluido que las balsas lipídicas (microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos) tienen un papel importante en la infección y entrada del virus(19-20). VP5 media la interacción entre el rotavirus y la proteína de choque térmico (Hsc70) en la superficie celular como un paso posterior a la fijación(21). Se ha demostrado que VP5 sufre un reordenamiento, similar a la que se encuentra en las proteínas de los virus envueltos de fusión, lo que podría mediar la penetración de la membrana por el rotavirus durante la entrada(22).

**Figura 1-1:** Ubicación de las proteínas estructurales en la partícula viral(16).



Entre las proteínas virales implicadas en el proceso de entrada a la célula se ha encontrado que rotavirus dependientes de ácido siálico (AS), inicialmente interactúan con AS sobre la superficie celular del dominio VP8(14, 23). Varias investigaciones han encontrado que este virus se une a la superficie celular por interacción con la integrina  $\alpha 2\beta 1$ (24). Después del contacto inicial del rotavirus con AS y la integrina  $\alpha 2\beta$ , el virus interactúa con otras proteínas de la célula huésped: Hsc70- $\alpha v\beta 3$ -PDI y  $\alpha x\beta 2$ . La interacción viral con Hsc70 es mediada por un dominio en VP5(25-27)

La partícula viral pierde las proteínas de la capa externa y se activa la transcripción que depende de la RNA polimerasa viral (VP1). Los transcritos virales recién sintetizados tienen dos funciones; por una parte funcionan como mRNAs que dirigen la síntesis de las seis proteínas estructurales (VP1-VP7) y las seis proteínas no-estructurales (NSP1-NSP6) del virus y por la otra, sirven como plantillas para la síntesis de la cadena negativa (que es complementaria al mRNA) y da lugar al RNA de doble cadena (dsRNA) que constituye el genoma viral (13).

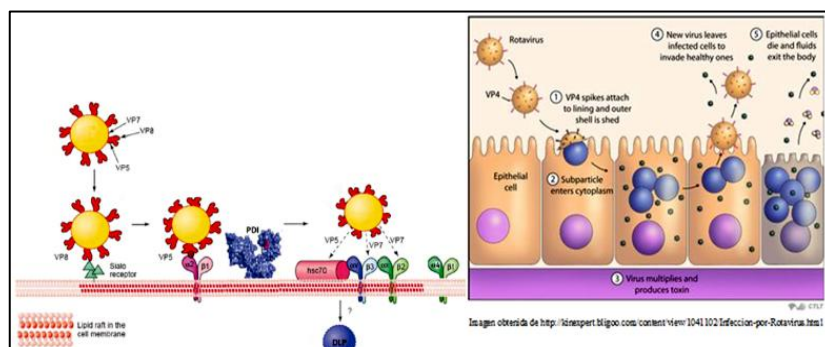
Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales, de 3 a 4 horas después de la infección, se forman en el citoplasma celular estructuras electrodensas llamadas viroplasmos, en donde se ha propuesto que se lleva a cabo la replicación del genoma viral. En estas estructuras también se ensamblan las partículas de doble capa que posteriormente geman al interior del retículo endoplásmico y adquieren durante este proceso la tercera capa proteica, dando lugar a la partícula madura. Las proteínas NSP2 y NSP5 son esenciales para la formación de los viroplasmos, ya que en ausencia de cualquiera de ellas no se forman estas estructuras y el ciclo replicativo del virus se interrumpe(19).

Poco tiempo después de su entrada, el virus se apodera de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula, de modo que la mayoría de las proteínas que son sintetizadas durante la infección son las proteínas virales y la síntesis de proteína celular se ve casi abatida completamente. Los mRNAs virales tienen una estructura Cap- en el extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los mRNAs celulares, no contienen poli-A en el extremo 3', y en su lugar, tienen una secuencia consenso (GACC3') que está conservada en los once segmentos del RNA virales(13).

Los RNAs recién sintetizados cumplen dos funciones: como RNAs mensajeros que dirigen la traducción de las proteínas del virus y como plantillas para la síntesis de los RNAs 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 electrodensas denominadas viroplasmos, que están compuestos de grandes cantidades de RNA y proteínas virales. Estos DLP's presentes en los viroplasmos (que se encuentran alrededor del RE), geman hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE) y la proteína NSP4 funciona como receptor de la DLP en la membrana del RE y favoreciendo su gemación; durante este proceso, las DLP's adquieren una membrana lipídica transitoria que contiene NSP4/ VP7/ VP4. Finalmente, las partículas envueltas pierden la membrana lipídica, NSP4 se disocia y la capa externa, formada por VP4 y VP7, adquiere su conformación final. Aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo este último paso en la morfogénesis no está claro (28-29). Una vez las partículas han madurado, son liberadas al exterior de la célula mediante evaginación a través de la membrana del retículo endoplásmico, donde adquieren las proteínas de la cápside más externas. Finalmente los viriones maduros son liberados de la célula por lisis, (Figura 1-2)(12)..

Todo el ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular, sin necesitar el núcleo de la célula(12).

**Figura 1-2:** Esquema del ciclo replicativo viral(12).



## 2. Proteínas celulares y EROs

Durante la infección por rotavirus, algunas proteínas celulares pueden estar participando de forma directa o indirecta en el proceso infeccioso viral o como defensa de la misma célula ante el ataque de este agente extraño.

### 2.1. Proteína de choque térmico de 70 kilodalton (Hsc70)

Las proteínas de choque térmico de 70 kilodalton (Hsc70s) son expresadas ubicuamente y en todos los organismos vivientes, están implicadas en el plegamiento de proteínas y por tanto en su estructura, son necesarias para el correcto desarrollo de la fisiología celular; además, son especialmente abundantes en respuesta a estrés térmico y de otros tipos. Los genes codificantes de miembros de la familia de proteínas son sobreexpresados en presencia de estrés térmico o en presencia de tóxicos(26, 30). La familia de HSPs de 70 kDa incluye las proteínas Hsc70 y Hsc73 que son de expresión constitutiva en la célula y las proteínas Hsp70 y Hsp72 que son inducibles por incremento de temperatura(30). La proteína Hsc70, se caracteriza por tener un dominio N terminal-ATPasa que tiene una estructura terciaria similar a la de la actina y un dominio C-terminal con una estructura secundaria similar al dominio de unión de péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I (31-32). El dominio N terminal-ATPasa es el más conservado; alrededor de 64% con respecto a las demás proteínas HSP, mientras que el dominio C-terminal es el más variable y es la zona de unión con el péptido(33). Ambos dominios están unidos por una región sensible a proteasas; esta proteína también funciona como una ATPasa en el desmontaje de vesículas recubiertas de clatrina durante el transporte de componentes a través de la membrana celular (34-35).

Se ha identificado que la forma constitutiva Hsc70 juega un papel importante en el proceso para la entrada de rotavirus en las células MA104 (20, 25, 36) e intestinales en ratón lactante de la cepa ICR(35).

### 2.2. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)

La proteína disulfuro isomerasa (PDI) es de aproximadamente 490 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 56 kDa, esta proteína hace parte de la familia de enzimas tiol-reductasas, las cuales están estructuralmente relacionadas e involucradas en el correcto plegamiento, formación y remodelación de los puentes disulfuro de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) rugoso. Las PDIs presentan dos dominios externos (a y a') que son catalíticos y proporciona la actividad oxido-reductasa y disulfuro isomerasa, y dos dominios internos (b y b') que le confiere algunas de las interacciones no-covalentes con los sustratos, PDI se sobreexpresa bajo condiciones de estrés y la inhibición de esta proteína reduce la capacidad de la célula de sobrevivir a esta condición(37-38).

Por medio de los dominios externos, PDI en forma oxidada se reduce al formar un puente disulfuro mixto con una cisteína del sustrato, este puente se abre en un paso subsiguiente mediante la formación de un puente disulfuro interno del sustrato, quedando PDI en su forma reducida, la cual se vuelve a oxidar mediante un sistema de reciclado en donde el último componente es una enzima denominada Ero1p, la cual transfiere los electrones al oxígeno. Igualmente la

isomerización se da por una sucesión de reacciones de óxido-reducción (redox) catalizada por estos mismos dominios, que interconvierten los grupos tiol/disulfuro (-SH/-S-S-) de las cisteínas de las proteínas, ocasionando de esta manera cambios conformacionales alternativos (isómeros) en las proteínas sobre las cuales actúan las PDIs(39).

Respecto al rotavirus, PDI está involucrada en la formación y reordenamiento de los enlaces disulfuro intramoleculares para la maduración de la proteína rotaviral VP7 que se produce después de la traducción. También se ha determinado que la presencia de PDI en los microdominios lipídicos rafts juegan un papel importante en la entrada del rotavirus a la célula(40-41).

### **2.3. Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ) y Pioglitazona**

El receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ) pertenece a la familia de los receptores nucleares de hormonas, que directamente regulan la transcripción de genes diana (42). PPAR $\gamma$  juega un papel crucial en la adipogénesis y la sensibilización a la insulina. Por otra parte, PPAR $\gamma$  se ha reportado que afectan la proliferación celular y diferenciación de las vías en varias neoplasias(43).

La proteína PPAR $\gamma$  se encuentra ampliamente expresada en el organismo, incluyendo el tejido adiposo, vascular, cardiaco y el sistema inmune. Existen además otras isoformas de PPAR codificadas por diferentes genes: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  los cuales junto con PPAR $\gamma$  han surgido como blanco terapéutico de diversos desordenes inflamatorios(43).

La activación de los distintos PPARs por sus respectivos ligandos resulta en la formación de heterodímeros con otro receptor nuclear y de esta forma activan o suprimen diversos patrones de expresión génica, aunque los mecanismos involucrados aún permanecen desconocidos(44). Los ligandos de PPAR $\gamma$  incluyen al metabolito natural 15-deoxy- $\Delta$ 12,14 Prostaglandina J2(45), ácidos grasos poliinsaturados, fármacos antiinflamatorios no esteroideos(46) y ligandos sintéticos como los miembros de la familia de tiazolidindionas (TZD)(47). Estos últimos son una clase de fármacos empleados en el tratamiento de diabetes tipo II ya que poseen efecto hipoglucemiante debido a su acción sobre el tejido graso y músculo esquelético porque aumentan la sensibilidad a insulina. Además, existen evidencias de que la unión de TZDs a PPAR $\gamma$  ejerce también efectos antiinflamatorios y posiblemente cardioprotectores (48-49).

La pioglitazona pertenece al grupo de fármacos de la clase Tiazolinediona(50), es agonista de PPAR $\gamma$  y en menor medida de PPAR- $\alpha$  (51-52). Los receptores PPAR regulan la transcripción de genes por dos mecanismos: transactivación (ADN-dependiente) y transrepresión (ADN independiente), siendo este último mecanismo el que explicaría la acción antiinflamatoria de los agonistas PPAR. La transactivación de los receptores nucleares PPAR $\gamma$  regula la transcripción de una serie de genes sensibles a la insulina implicados en el control del metabolismo de la glucosa y los lípidos. Esta transcripción continúa con la aparición de proteínas que influyen en los procesos biológicos, que en el caso de la pioglitazona serían la captación de la glucosa y su utilización en los órganos periféricos, la producción hepática de glucosa, la lipólisis y la adipogénesis. Aunque el tejido adiposo sólo hace uso del 10% del total de la glucosa que se utiliza gracias a la acción de la insulina, tiene un papel importante en el metabolismo sistémico de la glucosa. Los receptores PPAR $\gamma$  son esenciales para la diferenciación y proliferación adipocitaria, así como para la captación y almacenamiento de ácidos grasos libres (AGL) por parte del tejido adiposo, y se expresan principalmente en el mismo (PPAR $\gamma$ -1, PPAR $\gamma$ -2 y PPAR $\gamma$ -3), mientras que su

concentración en miocitos es menor (básicamente PPAR $\gamma$ -1), por lo que la mejora de la captación de glucosa por parte de las células musculares podría ser en gran medida un efecto indirecto debido a la interacción de las TZD con los adipocitos. Entre los mediadores secretados por los adipocitos maduros que podrían estar involucrados en la conexión entre músculo y grasa se encuentran la leptina, AGL, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), adiponectina y resistina(53-54).

Existen reportes proponiendo modular la expresión de PPAR $\gamma$  para disminuir la respuesta inflamatoria a virus como influenza, en virtud del papel antagonista de la actividad de la vía NF $\kappa$ B, AP1 y STAT(55). Igualmente, se conoce que PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  regulan la respuesta inflamatoria *in vivo* e *in vitro* porque inhiben la activación de NF $\kappa$ B(56-57).

Investigaciones indican que la producción de óxido nítrico (NO) es importante en la infección de rotavirus(57); se señala que la proteína no estructural de rotavirus, NSP4, provoca un incremento de la secreción de NO en células epiteliales humanas HT-29. Igualmente, se reporta un aumento en la concentración de los productos derivados del NO en la orina de los animales infectados con rotavirus, con la participación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el modelo murino. Existen reportes que indican que los agonistas de PPAR $\gamma$  reducen la producción de NO y la actividad de la vía NF $\kappa$ B(58). Probablemente, los agonistas pioglitazona y rosiglitazona tienen efectos inhibitorios en la infección de rotavirus porque inhiben la activación de NF $\kappa$ B.

## 2.4. Factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B)

NF $\kappa$ B (Factor Nuclear kappa Be) es un factor de transcripción que juega un papel importante en el sistema inmunológico(59-61). NF $\kappa$ B regula la expresión de citoquinas, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), factores de crecimiento, inhibidores de la apoptosis y las enzimas efectoras en respuesta a un ligando de los receptores involucrados en la inmunidad incluidos los receptores de células T (TCR) de células B (BCR receptores) y miembros de la familia Toll-like receptor del receptor/IL-1. NF $\kappa$ B también juega un papel en el desarrollo y la actividad de un número de tejidos, incluyendo el sistema nervioso central(62).

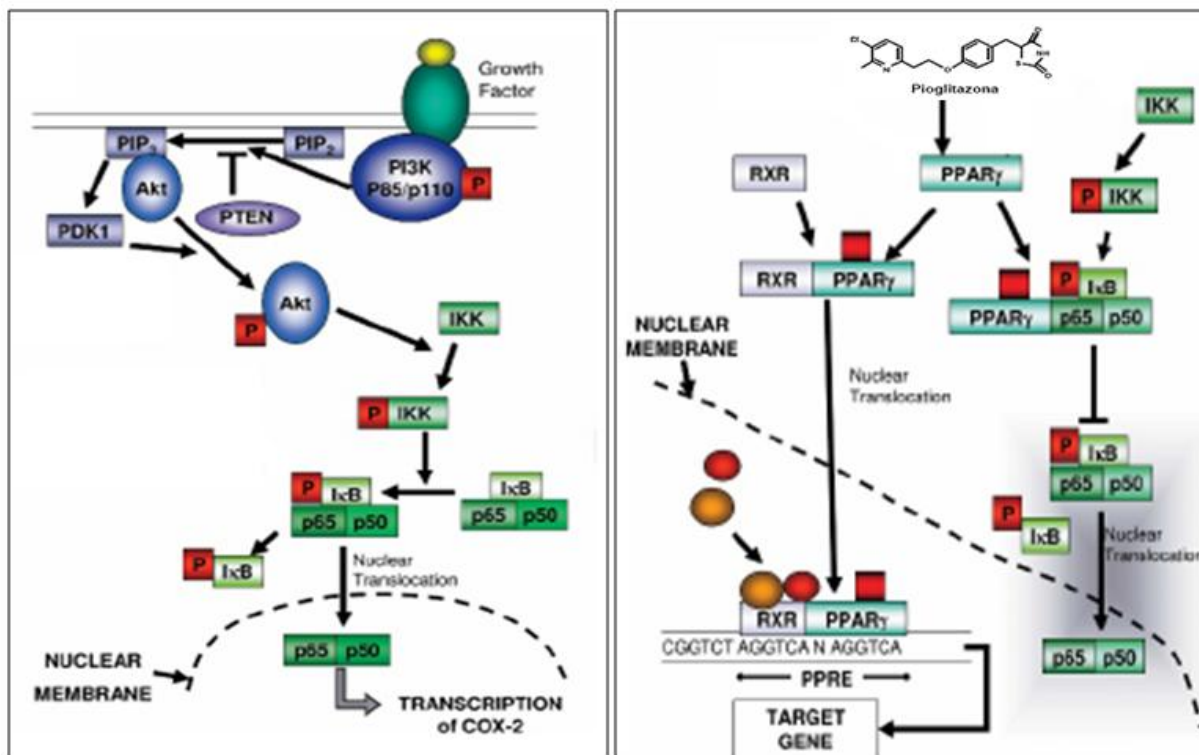
Estructuralmente, NF $\kappa$ B es un complejo homo o heterodimérico, que puede estar compuesto por varias subunidades proteicas denominadas p50, p65, p52, c-Rel y RelB.(63-64). Las subunidades p65, c-Rel y RelB se sintetizan como tales, las subunidades p50 y p52 se originan como grandes proteínas precursoras (p105 y p100, respectivamente). La p50 se origina por procesamiento constitutivo a partir de la p105, y la p52 se forma a partir de la p100, en un proceso complejo que implica pasos de fosforilación y ubiquitinización(64).

NF $\kappa$ B es un factor de transcripción altamente regulado. Así sus subunidades aparecen retenidas en el citoplasma celular por proteínas de la familia I- $\kappa$ B (proteínas inhibidoras de  $\kappa$ -B), con 7 miembros denominados I- $\kappa$ B $\alpha$ , I- $\kappa$ B $\beta$ , I- $\kappa$ B $\epsilon$ , I- $\kappa$ B $\gamma$ , I- $\kappa$ BNS y los precursores p100 y p105(59). I- $\kappa$ B $\beta$  sólo aparece en el citosol, I $\kappa$ B- $\alpha$  pueda encontrarse en el núcleo formando complejos NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ . Clásicamente, la “activación canónica” de NF $\kappa$ B en respuesta a citoquinas proinflamatorias, mitógenos o proteínas virales, presenta un punto crítico: la activación del llamado complejo quinasa de I $\kappa$ -B (IKK), que fosforila a I- $\kappa$ B en residuos de serina(59). I- $\kappa$ B fosforilada es reconocida por la proteína  $\beta$ -TrCp, que la acopla a una ubiquitina ligasa específica perteneciente a la familia SCF, para que ésta lleve a cabo su poliubiquitinización en residuos de lisina(65). Una vez ubiquitinado, I- $\kappa$ B es degradado por la subunidad 26S del proteasoma. De esta forma, NF $\kappa$ B libre se puede translocar al núcleo, unirse a elementos específicos en el ADN, y activar la transcripción génica. El complejo IKK está constituido por tres subunidades asociadas íntimamente, dos de ellas catalíticas IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ , y otra reguladora, NEMO. La activación de

ambas IKK depende de su capacidad para dimerizar y de que sean fosforiladas en serina. De las tres subunidades, IKK- $\beta$  y NEMO parecen ser esenciales para el funcionamiento del complejo, (Figura 2-3)(66).

Estudios indican que la infección con rotavirus activa rápidamente a NF $\kappa$ B e induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias(67-68).

**Figura 2-3:** Vía de señalización de NF $\kappa$ B y su relación con PPAR $\gamma$ (67).



## 2.5. Ciclooxygenasa-2 (Cox-2)

La Ciclooxygenasa (Cox) o prostaglandina-endoperoxido sintasa EC 1.14.99.1, es una enzima que permite al organismo producir unas sustancias llamadas prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La ciclooxygenasa-2 tiene como función mediar en los procesos de inflamación y en la señalización por prostanoideos. La Cox-2 se expresa tras inducción inflamatoria, aunque es constitutiva en bajas cantidades y se encuentra en el cerebro, corazón, ovarios, músculos estriados, SNC y riñón(69-70).

Cox-2 puede ser inducida por varios factores: la interleucina 1 (IL-1), el factor de crecimiento de fibroblastos b (bFGF), el factor de crecimiento de transformación (TGF), el factor de necrosis tumoral (TNF), los lipopolisacáridos (LPS) y la activación del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) mediante especies reactivas de oxígeno. Finalmente, el incremento del Ca<sup>++</sup> intracelular que causa la PGE2 al activar el receptor EP-1 puede regular la expresión de la Cox-2. El aumento de Ca<sup>++</sup> intracelular causa la activación de la proteína cinasa C (PKC) la cual activa el NF $\kappa$ B (69).

Uno de los factores importantes que contribuyen a mantener este círculo vicioso, es el aumento de la Cox-2 que en estrés oxidativo es oxidada. Sin embargo, la Cox-2, lejos de quedar inoperante por la oxidación, incrementa unas veinte veces su actividad enzimática. Ya que la Cox-2 es una generadora importante de especies reactivas de oxígeno pues su actividad hace que se expresen más interleucinas y Cox-2, contribuye a que se perpetúe el círculo de inflamación durante todo el transcurso de la enfermedad(71).

Se ha encontrado aumento en la expresión de Cox-2 durante la infección con algunos virus como herpes y VIH. Algunos estudios han demostrado que las prostaglandinas PGE2 juegan un papel esencial en la infección con rotavirus ya que al inhibir el efecto de la Cox hay una disminución en la infección. Es muy probable que PGE2 esté involucrada en la síntesis de proteínas virales y la producción de nuevas partículas de rotavirus(70, 72).

## **2.6. Especies reactivas de oxígeno (EROs o ROS)**

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) o su sigla en inglés (ROS) son un conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno, entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen un electrón desapareado en alguno de sus orbitales electrónicos, lo que las hace altamente reactivas; son producidas en el organismo principalmente por la cadena de transporte de electrones(73). Las EROs incluyen el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); además, habría que considerar, entre las ERO que existen, a las de nitrógeno que en su estructura presentan átomos de oxígeno; estas especies reactivas de nitrógeno (ERN) incluyen al óxido nítrico (NO) y a los radicales peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ )(74-76). A nivel proteico, las EROs ocasionan modificaciones estructurales y conformacionales al oxidar aminoácidos, lo que produce cambios en las características bioquímicas de las proteínas. Un hecho común durante varias infecciones virales es la interrupción del equilibrio redox en las células infectadas. Esto ocurre a través de una disminución en niveles de enzimas antioxidantes, el agotamiento de la molécula antioxidante celular (glutación) y a través de una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), que permiten la rápida muerte de las células infectadas y por lo tanto, el aumento de la propagación viral en el organismo observándose en infecciones causadas por el virus de la influenza, HBV, VHC o VIH(77-82). Las EROs pueden ser moléculas de señalización o de estimulación de la proliferación celular(74-75) lo que contribuye a una defensa antiviral(83). Sin embargo, un fuerte aumento de su producción es perjudicial para células debido al estrés oxidativo y al daño de los componentes celulares(75).

### 3. Planeación general

#### 3.1. Problema

Las vacunas disminuyen la intensidad de los síntomas pero no evitan que se presenten y en algunos casos, habrá niños no vacunados. Por lo tanto, se requiere tener alternativas farmacológicas para el manejo de la infección en los sujetos en quienes no se puede prevenir el contagio; adicionalmente, no se conoce completamente los mecanismos de protección de las vacunas de rotavirus, ni tampoco se han esclarecido todos los mecanismos patogénicos de este virus.

Por esta razón, se requiere continuar investigando sobre fármacos que interfieran con la infección producida por Rotavirus. Investigaciones previas en nuestro laboratorio, indican que algunos AINES, agonistas de PPAR $\gamma$  y antioxidantes como NAC y ácido ascórbico, reducen la infección de Rotavirus. Sin embargo, se requiere precisar a partir de qué momento de la infección los diferentes fármacos son efectivos en interferir con el proceso infeccioso y si se presentan cambios en algunas proteínas celulares, que se sabe están relacionadas directa o indirectamente con el fármaco o con la infección de rotavirus. Específicamente, determinar si el fármaco pioglitazona produce cambios sobre las proteínas celulares PPAR $\gamma$  y NF $\kappa$ B en ratones adultos ICR infectados con Rotavirus ECwt y a qué tiempo post-infección la pioglitazona ejerce un efecto inhibitorio sobre el proceso infeccioso del virus.

#### 3.2. Antecedentes

Nuestro grupo de investigación ha reportado que al interferir el intercambio de grupos tiol/disulfuro en la membrana celular, utilizando DTNB o bacitracin, se bloquea la infección por rotavirus(40). Igualmente, al aplicar fármacos como AINES (antiinflamatorios no esteroideos) y agonistas de PPAR $\gamma$  se reduce la infección *in vitro* en líneas celulares(10) y en vellosidades aisladas de intestino de ratón e *in vivo* en ratón infectado con rotavirus silvestre Ecwt(8, 84-85).

Sin embargo, estos trabajos no han determinado los mecanismos por medio de los cuales los diferentes fármacos interfieren con el proceso infeccioso, no han precisando a partir de qué momento de la infección los diferentes fármacos son efectivos en interferir con el proceso infeccioso y no han determinado los cambios en proteínas celulares que se sabe están relacionadas directa o indirectamente con el fármaco o con la infección de rotavirus.

#### 3.3. Justificación

Nuestros resultados indican que hay fármacos eficientes en combatir la infección de rotavirus tanto *in vitro* en líneas celulares(10), como *in vivo* en ratones lactantes ICR (8) y en niños(86). Confirmamos que otros AINES no reportados (ibuprofeno y diclofenaco) también inhiben la infección de rotavirus, como lo hace indometacina(72). En la actualidad tratamos de aclarar los posibles mecanismos por medio de los cuales los fármacos inhiben la infección, intentando identificar vías bioquímicas comunes que los relacione en la célula. También intentamos esclarecer la relación existente entre algunas proteínas celulares y la infección de rotavirus para tratar de entender la conexión entre rotavirus- proteínas celulares-fármacos. Mediante diferentes trabajos se intenta identificar las vías bioquímicas que relacionan cada fármaco con la capacidad inhibitoria



que han mostrado. En conjunto, pareciera que la infección de rotavirus favorece la activación de vías oxidativas y pro-inflamatorias, de tal manera que al suministrar a la célula fármacos con capacidad anti-oxidante o que actúen disminuyendo o inactivando las vías oxidativas y pro-inflamatorias se inhibe la infección de rotavirus. Especulamos que una vía común puede ser la pro inflamatoria, relacionada con la actividad de NFκB. Se conoce que fármacos con capacidad reductora como NAC, ácido ascórbico, agonistas de PPARγ o inhibidores de COX, como los AINES, pueden disminuir o antagonizar vías relacionadas con NFκB. Al igual que los agonistas pioglitazona y rosiglitazona tienen efectos anti-inflamatorios porque inhiben la activación de NFκB(8). Se ha propuesto que al modular la expresión de PPARγ se disminuye la respuesta inflamatoria a virus como influenza, en virtud del papel antagonista de la actividad de la vía NFκB, AP1 y STAT(87). Igualmente, se conoce que PPARα y PPARγ regulan la respuesta inflamatoria *in vivo* e *in vitro*(88).

Con base en el anterior conocimiento se quiere determinar si el fármaco pioglitazona (agonista de PPARγ) produce cambios sobre proteínas celulares como PPARγ y NFκB en ratones adultos ICR infectados con Rotavirus (ECwt) y establecer a que tiempo post-infección la pioglitazona ejerce un efecto inhibitorio.

### **3.4. Objetivos**

#### **3.4.1. Objetivo general**

Evaluar la expresión de las proteínas PPARγ y NFκB en vellosidades intestinales de ratones adultos ICR, infectados con Rotavirus (ECwt) y tratados con pioglitazona

#### **3.4.2. Objetivos específicos**

- Determinar cambios en la expresión de las proteínas PPARγ y NFκB al tratar con pioglitazona ratones adultos ICR o vellosidades aisladas infectadas con Rotavirus ECwt.
- Establecer a partir de qué tiempo post-infección la pioglitazona ejerce un efecto inhibitorio en el proceso infeccioso de rotavirus.
- Determinar cambios en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO u “ROS”) en vellosidades intestinales al tratar con pioglitazona ratones adultos ICR infectados con Rotavirus ECwt.

### **3.5. Hipótesis**

PPARγ inhibe directamente a NFκB mediante su unión con la subunidad p65 de NFκB, impidiendo de esta manera su activación y posterior transcripción de genes pro-inflamatorios por esta vía de señalización(67). La infección de rotavirus activa a NFκB por mecanismos no determinados(68). Por lo anterior, hipotizamos que al administrar pioglitazona (agonista de PPARγ) en ratones ICR adultos infectados con la cepa de Rotavirus ECwt, aumenta los niveles de PPARγ e inhibe la activación del factor NFκB; disminuyendo la infección del virus en las vellosidades intestinales del ratón.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Animales, virus y reactivos

Se utilizaron ratones machos de la cepa ICR de 52 días de edad, con peso promedio entre 25 a 30 gramos, procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS). La cepa ICR se caracteriza por ser no consanguínea (animales exocriados), manteniendo animales genéticamente heterogéneos(89) los protocolos de experimentación en animales fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, de acuerdo a los lineamientos establecidos.

El Rotavirus murino tipo- silvestre (Ecwt) fue suministrado amablemente por el Doctor M. Franco (Instituto de Genética, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia).

Se utilizaron los siguientes sueros hiperinmunes: anti-ECwt generado en ratón, cabra, conejo y cobayo, sueros hiperinmunes anti-NSP4, anti-NSP5, anti-PDI y anti-Hsc70 generados en conejo. Estos sueros fueron generados en el Laboratorio de Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional de Colombia en trabajos previos.

Los anticuerpos (Acs) comerciales que se utilizaron fueron: Acs policlonales anti-PDI (SC17222), anti-Hsc70 (SC1059), anti-PPAR $\gamma$  (SC6285) generados en cabra; anti-NF $\kappa$ B (Zymed) generado en conejo, anti-p-NF $\kappa$ B p50 (ser 337) (SC33022) generado en conejo, anti-IK $\beta$  (SC271782) generado en conejo, anti-Cox-2 (SC18619) generado en cabra y Acs monoclonales anti-PPAR $\gamma$  (SC7273), anti-p-NF $\kappa$ B p50 (ser 337) (SC271908), anti-cox-2 (SC19999) y PDI (SC376369) generados en ratón. Todos estos Acs contienen 200 $\mu$ g/ml, de Santa Cruz Biotechnology, INC. El Ac anti-p-NF $\kappa$ B reconoce una corta secuencia que contiene Ser 337 fosforilada de NF $\kappa$ B p50 de origen humano.

Los Acs secundarios que se utilizaron fueron: cabra anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (SC2313), conejo anti-cabra IgG conjugado con peroxidasa (SC2020), conejo anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa (SC358914), burro anti-ratón IgG marcado con FITC (SC2024), cabra anti-conejo IgG marcado con FITC (SC2359). Todos estos Acs contienen 400 $\mu$ g/ml. También se usó cabra anti-conejo IgG marcado con CY5 (SC45101 200 $\mu$ g/ml). Los anteriores Acs procedían de Santa Cruz Biotechnology, INC. El conejo anti-cabra IgG marcado con Alexa 594 (400 $\mu$ g/ml de Invitrogen).

Se utilizó el Kit Oxidative Stress I No.8401001 para la detección de especies reactivas de oxígeno (Thermo Scientific).

El reactivo agonista del factor de transcripción celular PPAR $\gamma$  utilizado fue: pioglitazona (Cód. 83011 de Sigma).

La administración del medicamento y mantenimiento de los ratones se realizó teniendo en cuenta la Ley 84 de 1989 (Estatuto Nacional de Protección de los Animales)(90-91). Los ratones fueron mantenidos durante un tiempo máximo de tres días, en un alojamiento con dimensiones de 36,5cm de alto, 39cm de ancho y 31cm largo, construido por vidrio acústico evitando el estrés causado por el ruido, los ratones en parejas fueron introducidos en una jaula de metal con una malla de ventilación en la parte superior de 25cm de largo, 12,5cm de alto y 18cm de ancho; cada jaula tuvo zona de alimentación aislada y se les administro en un biberón agua de la llave previamente autoclavada a libre demanda y como alimento concentrado para roedores (Agrinal<sup>R</sup>), la temperatura se mantuvo de 20 a 22°C generada por un bombillo de 40 Watts. El alojamiento fue

ubicado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

## 4.2. Aislamiento de las vellosidades intestinales

La extracción de las vellosidades del intestino delgado de los ratones fue realizada según método descrito(35) en cabina de flujo laminar bajo estrictas condiciones de esterilidad. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical cumpliendo las normas establecidas en la Resolución 008430 de Octubre de 1993, Ministerio de Salud, Republica de Colombia(90-91). Se limpio la piel con alcohol antiséptico 70% y se realizo un corte longitudinal. Se extrajo el intestino delgado y mantuvo en Medio Esencial Mínimo EAGLE modificado (MEM); con ayuda de una jeringa colocada en el extremo más ancho del intestino (duodeno) se lavo con 5ml de medio de cultivo con antibiótico (Kanamicina 100µg/ml, Ampicilina 100µg/ml y Anfotericina B 2,5µg/ml).

El intestino delgado se cortó en fragmentos de aproximadamente 0,5 cm en presencia de 7 ml de MEM con 1,5 mM de EDTA. Los fragmentos se recuperaron y se incubaron por 15 minutos a 37°C con agitaciones de 400 r.p.m. Con una punta de micropipeta de 1ml cortada en el extremo, se disgregaron las vellosidades dentro de cada tubo y se pasaron por una malla estéril (1mm<sup>2</sup> de poro) sobre una caja de Petri esterilizada. Los fragmentos que no pasaron la malla se colocaron nuevamente en 5 ml de MEM con EDTA 1,5mM y se realizo una segunda extracción bajo las mismas condiciones. Las vellosidades de las dos extracciones fueron mezcladas y para retirar residuos de EDTA, se lavaron dos veces con MEM sin EDTA. Durante el procedimiento, se precipitaron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Las vellosidades aisladas de ratones infectados y tratado con pioglitazona, junto con sus controles, se fijaron con metanol-ácido acético (3:1), durante 30 min a 4 °C (experimento *in vivo*). Las vellosidades aisladas de ratón no infectado se utilizaron para realizar la prueba *in vitro* (infectar y tratar con pioglitazona).

## 4.3. Diseño metodológico

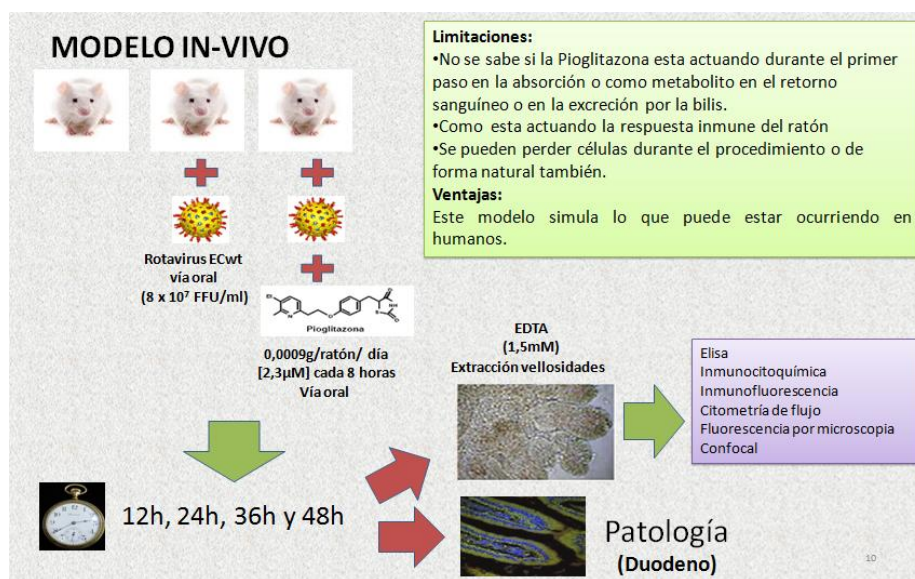
El desarrollo de este trabajo de investigación se llevo a cabo utilizando tres modelos: *in vivo*, *in vitro* y combinando los dos anteriores (*in vivo* e *in vitro*).

Para el modelo *in vivo*, ratones ICR adultos fueron infectados o no con rotavirus ECwt ya purificado(35, 86), con un título de  $7,8 \times 10^7$  UFF/ml, titulado en vellosidades intestinales aisladas. Este título es equivalente a 78.000 partículas virales por µl. Para infectar los ratones en las diferentes horas post-infección, se empleó 1 µl para 10 ratones, es decir, cada ratón recibió 7.800 partículas en 100 µl de PBS estéril. Los ratones ICR fueron infectados vía oral y después de dos horas post-infección (h.p.i) se les aplicó pioglitazona vía oral (0,9 mg/Kg peso ratón/día diluido en PBS estéril) administrada en tres porciones, una cada 8 horas, durante 2 días. La concentración fue determinada en un trabajo previo(8). Como control, a ratones no infectados se les administro pioglitazona en la misma dosis y rangos de tiempo anteriormente descritos.

Transcurrido 12, 24, 36 y 48 horas post-infección (h.p.i), los ratones fueron sacrificados, el intestino delgado fue extraído, una porción del intestino fue cortada (duodeno) y enviada a patología para la realización de cortes histológicos, de la porción restante de intestino se obtuvieron las vellosidades intestinales (descrito abajo), las cuales fueron utilizadas para ensayos

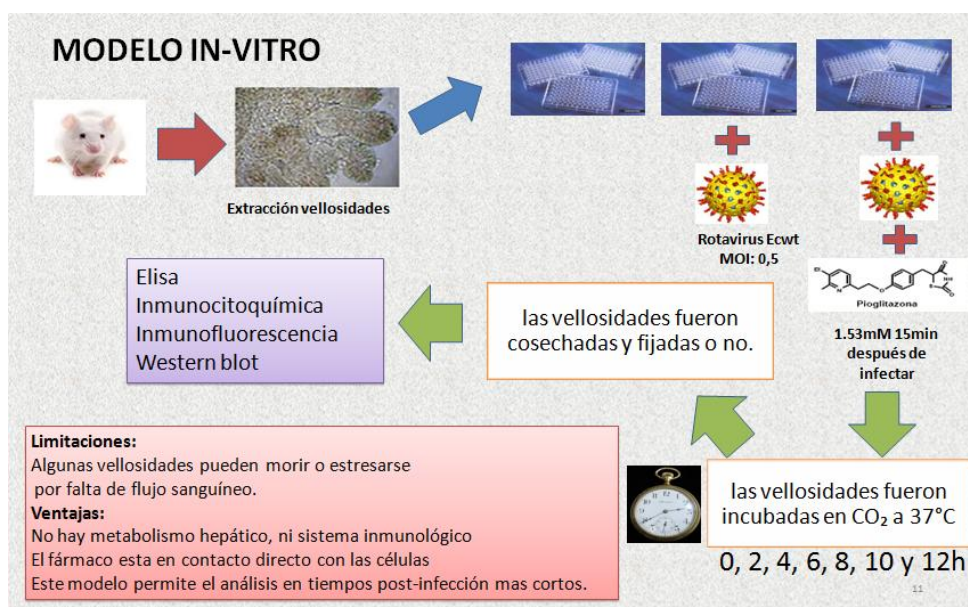
de elisa, inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, citometría de flujo y microscopia confocal (Figura 4-4)

**Figura 4-4:** Modelo *in vivo*



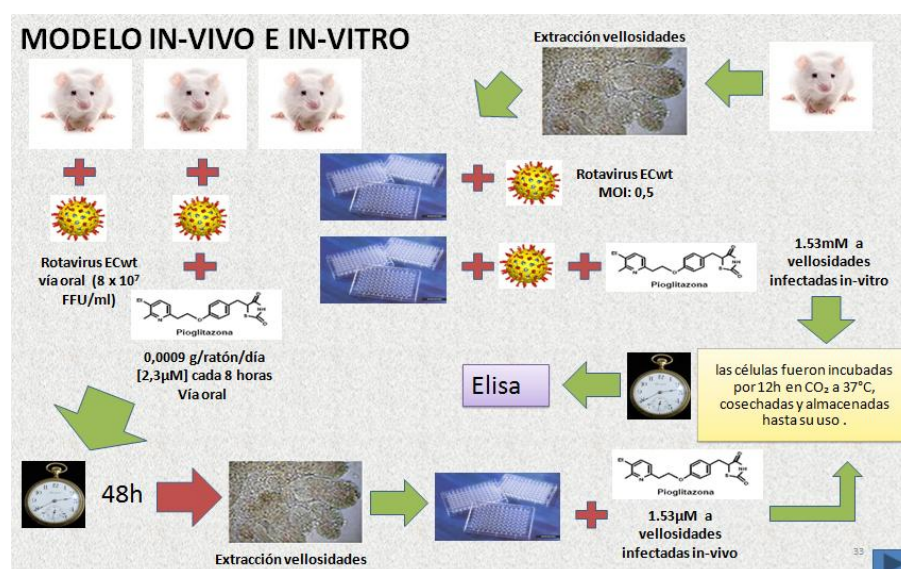
Para el modelo *in vitro*, ratones adultos ICR no infectados fueron sacrificados, el intestino delgado fue extraído y se aislaron las vellosidades intestinales. Estas vellosidades fueron homogenizadas en medio DMEM y sembradas en placas de 96, 16 o 6 pozos según el caso; fueron infectadas o no con rotavirus ECwt con un MOI de 0,5. A un grupo de vellosidades infectadas o no se les adicionó pioglitazona 15 minutos después de la infección a una concentración de 1,53 mM, posteriormente fueron incubadas a una temperatura de 37°C a una atmósfera de CO<sub>2</sub> por 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas. Transcurrido este tiempo fueron cosechadas y se procedió a fijarlas con metanol- ácido acético (3:3 v:v) o se congelaron hasta su uso. Para la hora cero las vellosidades fueron mantenidas en hielo durante todo el procedimiento. Estas vellosidades fueron utilizadas para la realización de ensayos de ELISA, inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y Western blot (Figura 4-5).

**Figura 4-5:** Modelo *in vitro*



Para determinar si en las vellosidades procedentes de ratones infectados *in vivo*, tratados o no con pioglitazona, modifican el curso de la infección, al cultivar las vellosidades *in vitro*, activando o no a PPAR $\gamma$ . Para esto, ratones ICR adultos fueron infectados o no con rotavirus ECwt y tratados con pioglitazona como se describió para el modelo *in vivo*. En este caso recibieron el fármaco por 48 horas, fueron sacrificados y se aislaron las vellosidades que fueron homogenizadas en medio DMEM y sembradas en placas de 96 pozos. Las vellosidades procedentes de ratones infectados *in vivo* que no habían recibido pioglitazona, *in vitro* se les aplicó pioglitazona y fueron cultivadas durante 12 horas. Las vellosidades procedentes de ratones infectados *in vivo* que habían recibido pioglitazona *in vivo*, se cultivaron durante 12 horas. Las vellosidades procedentes de ratones no infectados *in vivo*, se infectaron *in vitro* con rotavirus (MOI de 0,5) y se les aplicó o no pioglitazona a una concentración de 1,53 mM, fueron incubadas a una temperatura de 37°C a una atmosfera de CO<sub>2</sub> por 12 horas, cosechadas y almacenadas hasta su uso, para la realización del ensayo de ELISA de captura (Figura 4-6).

**Figura 4-6:** Modelo *in vivo* e *in vitro*



#### 4.4. Inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y confocal

Para determinar si al activar el receptor transcripcional PPAR $\gamma$ , *in vivo* e *in vitro*, se altera la infección de rotavirus se evaluaron los antígenos virales. Para esto, las vellosidades aisladas de ratones infectados y no infectados, tratados o no con pioglitazona se fijaron con metanol-ácido acético (3:1, v:v), se lavaron con PBS, se colocaron sobre una laminilla cubreobjetos y se secaron a 50°C durante 30 minutos. Se permeabilizaron con tritón 0,5% y con SDS 0,1% durante 15 minutos, se les adicioneo cloruro de amonio 50 mM por 30 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se dejaron secar. Las células adheridas a la laminilla se incubaron con suero hiperinmune anti-rotavirus (proteínas estructurales de rotavirus 1:2000 en PBS) generados en conejo o cabra, o anti- proteínas no estructurales (NSP4 o NSP5, 1:400 en PBS), generados en conejo, se incubaron en una cámara húmeda a 37°C durante una hora. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS para retirar el exceso de anticuerpo, se añadió anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (HRP 0.066 $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubó por una hora a 37 °C en cámara húmeda. Se lavaron las células una vez con PBS y se revelaron utilizando 20 $\mu\text{L}$  de una solución que contiene aminoetilcarbazol 0,64mg/ml (AEC), buffer acetato pH 5 (acetato de sodio 0,030 M-ácido

acético 0,012M) y peróxido de hidrógeno al 0,36%, por 45 minutos. Finalmente, las células se lavaron con PBS para retirar el exceso de carbazol, visualizándose como una coloración rojiza cuando hay presencia de los antígenos virales. Las laminillas fueron fotografiadas en 15 campos representativos con un microscopio Van Guard utilizando una lente 100X; método anteriormente reportado (35). La presencia de antígenos virales se visualizó como una coloración rojiza, por la precipitación del carbazol.

Para determinar el porcentaje de infección, se contaron las células positivas y negativas, el número de células positivas se dividió por el total de células (sumatoria de infectadas y no infectadas). De esta manera se obtuvo el porcentaje de antígenos positivos en ratones infectados que recibieron o no fármaco. El efecto del fármaco en la infección se obtuvo como porcentaje, relacionando el porcentaje en los ratones tratados con pioglitazona respecto a los infectados que no recibieron el fármaco; éstos últimos tomados como 100%. Para el conteo se utilizó el programa Image J (plugins, cell counter).

Para determinar si al activar el receptor transcripcional PPAR $\gamma$ , *in vivo* e *in vitro*, se altera la expresión de proteínas celulares, relacionadas con PPAR $\gamma$  o la infección de rotavirus, se evaluaron NF $\kappa$ B (no fosforilado y fosforilado, que es la forma activa), PPAR $\gamma$ , PDI, Hsc70 o Cox-2. Para esto, las vellosidades aisladas de ratones infectados y no infectados, tratados o no con pioglitazona se utilizaron para realizar la inmunofluorescencia; las mismas laminillas donde se realizó la inmunocitoquímica luego de lavarlas con PBS se les agregaron (Acs) primarios generados en cabra anti-PDI (SC17222) y anti-Hsc70 (SC1059); generados en conejo anti-p-NF $\kappa$ B p50(ser 337) (SC33022), anti- NF $\kappa$ B (Zymed) o anticuerpo monoclonal anti-PPAR $\gamma$  (SC7273) generado en ratón. Todos estos Acs a una concentración de 0.2 $\mu$ g/ml en PBS fueron incubados por una hora a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se les adicionaron como anticuerpos secundarios un conjugado con FITC anti cabra o anti-conejo o anti-ratón (0.88 $\mu$ g/ml en PBS), por 20 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se lavaron con PBS y se fotografiaron en microscopio de fluorescencia (Van Guard) utilizando una lente 100X. Se tuvo en cuenta que los Acs utilizados en la inmunofluorescencia fueran de diferente especie a los utilizados en inmunocitoquímica.

Se realizó el conteo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ (Analyze, measure), aplicando la siguiente fórmula:  $CTCF = \text{Densidad integrada} - (\text{Área seleccionada de la célula} * \text{medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia})$ .

Con el mismo propósito descrito arriba, se analizaron cortes histológicos duodenales de los ratones experimentales *in vivo* (infectados y no infectados, tratados o no con pioglitazona). Para esto, el extremo proximal del intestino delgado (duodeno) se colocó en paraformaldehído al 10%. Las muestras fueron enviadas a patología para realizar cortes histológicos según procedimiento estándar. Los cortes histológicos desparafinados se sumergieron en una solución de tritón al 1% y SDS 1% durante 30 minutos para permeabilizarlos, se realizaron tres lavados con PBS y posteriormente se adicionó cloruro de amonio por 30 minutos.

Luego, las láminas se incubaron en cámara húmeda con 200 $\mu$ l de un anticuerpo policlonal anti-rotavirus que reconoce proteínas estructurales de rotavirus en dilución 1:3000 por 1h a 37°C, se lavaron 3 veces con PBS y se adicionó anticuerpo secundario anti-conejo IgG-conjugado con peroxidasa (HRP, 0,066 $\mu$ g/ml) 1h a 37°C, se lavaron 3 veces con PBS y se revelaron con sustrato aminoetilcarbazol (AEC) por 1 hora a TA (1 mg/ml, en buffer 50 mM de acetato de sodio, pH 5y 0,04% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Posteriormente, estas mismas muestras se lavaron y se adicionó un anticuerpo policlonal generado en cabra que reconoce una de las siguientes proteínas celulares: Cox-2, PDI, Hsc70, PPAR $\gamma$  (0.2 $\mu$ g/ml) o NF $\kappa$ B-p o I $\kappa$ B (0.2 $\mu$ g/ml, conejo) por 1h a 37°C, se realizaron tres lavados con PBS.



A continuación se adicionó un anticuerpo generado en burro, FICT anti-cabra o anti-conejo (0.066µg/ml), se incubó durante 20 min en cámara húmeda a TA y en total oscuridad. Durante el procedimiento se tuvo en cuenta que no haya reacción cruzada entre los diferentes anticuerpos secundarios que reconozcan los primarios anti-rotavirus o anti-proteínas celulares. Finalmente se analizaron en un microscopio de Fluorescencia (VanGuard) y se tomaron fotografías representativas; para el análisis de cada fotografía se utilizó el programa Image J.

Para la técnica de microscopía confocal cortes histológicos fueron incubados simultáneamente Ac policlonales anti-p-NFκB p50 (ser 337), NFκB (reconoce p50 no fosforilado), IκB, generados en conejo, PDI, Hsc70 generados en cabra o PPARγ monoclonal generado ratón (0.2µg/ml) y anticuerpos anti-rotavirus generados en conejo, ratón o cabra (1:3000 en PBS) teniendo en cuenta que los anticuerpos utilizados en cada laminilla fueran de diferente especie. Los anticuerpos se incubaron por una hora a 37°C, posteriormente las células se lavaron tres veces con PBS y se les adicionó como anticuerpos secundarios un anti-conejo o anti-ratón conjugado con FITC (0.066µg/ml en PBS), CY5 anti-conejo (0.066µg/ml en PBS) y/o conjugado con Alexa 568 anti-cabra (0.066µg/ml en PBS). Se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 20 minutos, se lavaron con PBS y se fotografiaron en microscopio confocal (Nikon C-1). Los cortes histológicos fueron analizados por el programa ImageJ (plugins, colocalization Finder) y se calculó la colocalización entre las proteínas según el coeficiente de correlación de Pearson. (Un valor de 1 representa una correlación perfecta, -1 representa perfecta exclusión y cero representa una correlación aleatoria).

#### 4.5. ELISA de captura y directo

Para determinar si al activar el receptor transcripcional PPARγ, *in vivo* e *in vitro*, se altera la expresión de proteínas celulares, relacionadas con PPARγ o con la infección de rotavirus se evaluó IκB, PPARγ, PDI, Hsc70 o los antígenos virales mediante la técnica de ELISA. Para el ELISA de captura las vellosidades aisladas procedentes de los ratones con los diferentes tratamientos, se lisaron con buffer RIPA (150mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris, pH 8.0) y se sonicaron por 3 minutos a una amplitud de 30%, en presencia de fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) se adiciono azida de sodio 15mM y se conservo en congelación a -20°C hasta su uso.

En placas de 96 pozos se utilizó como anticuerpo de captura un suero hiperinmune que reconoce proteínas estructurales de rotavirus, generado en cobayo (1:500) o Ac policlonal que reconoce proteínas celulares PPAR-γ generado en cabra (0,2µg/ml) o sueros hiperinmunes anti-PDI y anti-Hsc70 generados en conejo (1:1000) se incubaron en 200µl de PBS a 37°C por dos horas. Posteriormente la placa se bloqueó con leche descremada 5% durante una hora a 37°C, se lavó con 200µl de PBS y se adicionaron 200µl de lisado celular procedentes de los ratones: para el modelo *in vivo* se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 76.87mg/ml de proteína total y para el modelo *in vitro* aproximadamente 18.76mg/ml de proteína total. La placa se incubó a 4°C durante toda la noche; se lavó tres veces con 200µl de PBS y se adicionó suero hiperinmune generado en conejo que reconoce antígenos estructurales de rotavirus (1:1000), a la placa cuyo anticuerpo de captura era de cobayo, para reconocer antígenos virales. Para reconocer proteínas celulares, se adicionó un anticuerpo (Ac) policlonal que reconoce proteínas celulares PDI y Hsc70 generados en cabra o Ac monoclonal que reconoce proteína celular PPAR-γ generado en ratón (0,2µg/ml en PBS). Los anticuerpos se incubaron a 37°C por una hora, se lavaron tres veces con PBS y se adicionaron anti-conejo o anti-cabra conjugado con peroxidasa (HRP 0.066µg/ml en PBS). Durante el procedimiento se tuvo en cuenta que los Acs primarios (de captura y de

reconocimiento del Ag) fuesen de diferente especie y que el Ac secundario conjugado no reconociera el Ac de captura. El ELISA se reveló utilizando como sustrato O-fenilenediamina diclorhidrato (OPD) diluido en buffer estable de peroxidasa. Como control se utilizaron los lisados de las vellosidades que no fueron infectadas (control negativo para la detección de rotavirus) y la incubación de todos los Acs, en ausencia de lisados (para la detección de las proteínas celulares PDI y Hsc70).

Se hizo ELISA directo en los casos en los cuales no se contaba con Acs de dos especies diferentes para realizarla en forma de captura. En este caso, se agregó el lisado celular a la placa de ELISA y se incubó toda la noche a 4°C, se lavó dos veces con PBS, se bloqueó con leche descremada al 5% durante 1h a 37°C y se adicionó como anticuerpos primarios IκB generado en conejo (0.2μg/ml en PBS). El anticuerpo se incubó a 37°C por una hora, se lavó tres veces con PBS y se adicionó anti-conejo conjugado con peroxidasa (HRP 0.066μg/ml en PBS). Se reveló utilizando sustrato con OPD (O-fenilenediamina diclorhidrato) diluido en buffer estable de peroxidasa. Las placas de ELISA fueron leídas a 490 nm en un lector ELISA Stat Fax 303/Plus.

#### 4.6. Detección de las especies reactivas de oxígeno

Para determinar si al infectar con rotavirus o activar el receptor transcripcional PPAR $\gamma$ , *in vivo* e *in vitro*, se altera la producción de las especies reactivas de oxígeno se utilizó el Kit Cellomics® Oxidative Stress I (Thermo scientific). Para esto, las vellosidades aisladas de ratones del experimento (infectados y no infectados, tratados o no con pioglitazona) se mantuvieron en medio DMEM, se les adicionó 16μg/ml de dihidroetidio (DHE) y 0,016ng/ml de Hoechst 33342 y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Después se centrifugaron por 2 minutos y el sobrenadante se desechó; se agregó paraformaldehído al 4% y se incubó a 37°C por 30 minutos; se centrifugó por 2 minutos y el sobrenadante se desechó. Las células se lavaron con PBS y finalmente se mantuvieron en PBS, se colocaron en láminas portaobjetos, se cubrieron con laminillas cubreobjetos, se sellaron con resina y se tomaron 10 fotografías representativas en un microscopio Van Guard, utilizando una lente 100X (Van Guard).

#### 4.7. Western Blot

Para determinar si al activar el receptor transcripcional PPAR $\gamma$ , *in vivo* e *in vitro*, se altera la expresión de proteínas celulares, relacionadas con PPAR $\gamma$  o con la infección de rotavirus se evaluó NFκB-p, IκB, PPAR $\gamma$ , PDI, Hsc70 o Cox-2 mediante la técnica de Western blot. Para esto, las vellosidades aisladas de ratones infectados y no infectados, tratados o no con pioglitazona fueron lisadas con buffer RIPA y sonicadas durante 3 minutos a una amplitud de 30% (tres veces por 1 minuto con descanso de 30 segundos), en presencia de PMSF. El lisado se almacenó a -70 °C hasta su uso. A las muestras se les adicionó buffer de Laemmli (0.125mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.02% azul de bromofenol.), se hirvieron por 3 min y se analizaron por electroforesis SDS-PAGE al 10%. En cada pozo del gel 50μl de un lisado que contenía 26,61 mg/ml de proteína total procedentes de los experimentos *in vitro*. Se determinó la cantidad de proteína de cada una de las muestras usando un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop® ND-1000). La muestra se transfirió a una membrana PVDF, en condiciones semisecas. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5%, se reveló utilizando anticuerpo generado en ratón PPAR $\gamma$  (0.2μg/ml en PBS). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo



conjugado con peroxidasa (HRP 0.4µg/ml) anti-ratón y se reveló con luminiscencia (Santa Cruz Biotechnology, USA).

#### **4.8. Citometría de flujo**

Para determinar si al activar el receptor transcripcional PPAR $\gamma$ , *in vivo*, se altera la expresión de proteínas celulares, relacionadas con PPAR $\gamma$  o con la infección de rotavirus se evaluó Nf $\kappa$ B, Nf $\kappa$ B-p, I $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ , PDI, Hsc70 o Cox-2 y los antígenos virales mediante la técnica de citometría de flujo. Para esto, se aislaron células intestinales con PBS-EDTA (5mM para separar las vellosidades), procedentes de ratones infectados con rotavirus Ecwt y tratados o no con pioglitazona; se fijaron con metanol-ácido acético (3:1 v:v) 1 h a 4 °C. Se hicieron tres lavados con PBS, dejando 5 min entre lavado y lavado, se incubaron 30 min con 50 mM de NH<sub>4</sub>Cl y se adicionaron los anticuerpos que reconocen las proteínas celulares, junto con anticuerpos anti-rotavirus, mencionados arriba para inmunofluorescencia. Los anticuerpos primarios (1.33µg/ml) se incubaron en PBS durante una hora a 37 °C, se lavaron tres veces y se adicionaron anticuerpos secundarios burro anti-ratón-FITC (0.88µg/ml en PBS) y cabra anti-conejo-Cy5 (0.88 µg/ml en PBS), se incubaron por 30 minutos y se dejaron con 200µl de PBS. Se detectó la fluorescencia en citómetro de flujo BD FACSCanto II. Durante el procedimiento se tuvo en cuenta que los Acs primarios fuesen de diferente especie. Como control se utilizaron Ac no relacionado y vellosidades con el Ac secundario.

#### **4.9. Viabilidad de vellosidades**

Para determinar la viabilidad de las vellosidades aisladas del intestino (modelo *in vitro*) para cada uno de los experimentos (no infectadas, infectadas con o sin tratamiento con pioglitazona, en las diferentes h.p.i.) en función de la integridad membranal, se realizó la técnica con azul de tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan ruptura en la membrana. Se tomaron vellosidades y se mezclaron con el colorante azul de tripán 93595 (Sigma Aldrich) en proporción 1:1 por 1 min y se contaron las vellosidades sin teñir (viables) y vellosidades de color azul (no viables) en 10 campos representativos para cada uno de los tratamientos.

#### **4.10. Reinfeción**

Al tratar las vellosidades infectadas con pioglitazona, se encontró disminución en la cantidad de antígenos virales pero no se sabe si es porque se está afectando el ensamble de los viriones (TLPs infecciosos) o se está afectando la cantidad de viriones, es decir, que la disminución de antígenos refleje es la baja cantidad de viriones sin alterar su ensamblaje. Para esto, vellosidades aisladas de ratones no infectados se sembraron en cajas de 96 pozos, fueron infectadas o no con rotavirus ECwt con un MOI de 0,5. A un grupo de vellosidades infectadas se les adicionó pioglitazona a una concentración de 1,53 mM, 15 minutos después de la infección. Posteriormente, fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> por 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas. Transcurrido este tiempo fueron cosechadas y congeladas. Para la reinfeción, las vellosidades se descongelaron y congelaron dos veces, posteriormente se sonicaron por 3 minutos a una amplitud de 30%, en presencia de fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF), después se activaron con 10 µg/ml de tripsina y de cada lisado

se hicieron diluciones (Tabla 4-1) que se aplicaron a nuevas vellosidades no infectadas sembradas en cajas de 24 pozos/200 $\mu$ l por pozo por duplicado. Todas las vellosidades fueron cosechadas a las 12 h.p.i. fijadas y analizadas mediante inmunocitoquímica, revelada por EAC y por inmunofluorescencia, (procedimientos anteriormente descritos).

**Tabla 4-1:** Diluciones del lisado celular en las diferentes horas pos-infección (h.p.i.)

h.p.i.	0	2	4	6	8	10	12
<b>Lisado Infectado</b>	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<b>Lisado Inf + Pio</b>	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64

Los resultados se graficaron como UFF/ml; por medio de la siguiente relación: factor de dilución en ml (1000  $\mu$ l/vol pozo en  $\mu$ l) x número de focos contados x la dilución donde había ese número de focos x número de campos contados en la laminilla.

#### 4.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el uso del programa GraphPad Prism 5 donde se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la cual se encontró que los diferentes datos tienen una distribución normal, posteriormente se aplicó prueba paramétrica de ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Dunnett donde el nivel de significancia de las pruebas estadísticas se graficaron como: \*, \*\*, \*\*\* y ns = no significativo; las pruebas se realizaron para cada grupo de ratones/ vellosidades por cada h.p.i. evaluada y para cada tipo de proteína.

## 5. Resultados

### 5.1. En las vellosidades procedentes de ratones infectados *in vivo* o en vellosidades aisladas del intestino delgado, infectadas *in vitro*, se disminuye la infección del rotavirus ECwt al tratarlos con pioglitazona.

En el modelo *in vivo*, para determinar si al activar el factor de transcripción PPAR $\gamma$  utilizando el agonista pioglitazona se modifica el porcentaje de infección, ratones ICR fueron infectados y tratados con pioglitazona durante 12, 24, 36 y 48 horas. La infección se evaluó como presencia de antígenos virales mediante ensayos de inmunocitoquímica y ELISA. El resultado de la inmunocitoquímica mostró que los ratones infectados a los que se les administro pioglitazona disminuye la presencia de antígenos virales, visualizados como una coloración rojiza, comparado con los infectados sin tratamiento en las diferentes horas post-infección “h.p.i.” (Figura 5-7A). Se determinó el porcentaje de infección realizando conteo de las células procedentes de ratones infectados y de ratones a los que se les administró pioglitazona. Para el conteo se utilizó el programa ImageJ (plugins, cell counter).

Para correlacionar la infección viral con la expresión de las proteínas celulares, relacionadas o no con PPAR $\gamma$ , siempre se analizó simultáneamente la infección viral y la expresión de la proteína celular. Al finalizar el trabajo se sumaron todos los porcentajes encontrados en cada uno de los experimentos y con cada una de las proteínas celulares evaluadas y se promedió. Los resultados que se exponen a continuación son el promedio y se repiten cuando se evaluó cada una de las proteínas celulares (**ver más adelante**). Analizando las proteínas estructurales del virus, las vellosidades de ratones infectados y tratados con pioglitazona presentaron una disminución de 58,55%, tomando como 100% la infección en los ratones no tratados; a las 12, 24, 36 y 48 hs disminuyó 58,55%, 67.6%, 69.2% y 64.69%, respectivamente. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) con n=4. (Tabla 5-2).

**Tabla 5-2** Modelo *in vivo*: porcentajes de infección de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales mediante inmunocitoquímica

GRUPOS DE RATONES		PORCENTAJE DE INFECCIÓN (Antígenos virales, evaluando proteínas estructurales)	DESVIACIÓN ESTANDAR	% DE DISMINUCIÓN DE LA INFECCIÓN(*)
RATONES NO INFECTADOS		0%	0	
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA		0% <b>NS</b>	0	
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	44.4%***	3.0	
	24 h.p.i.	47.9%***	3.1	
	36 h.p.i.	44.5%***	3.0	
	48 h.p.i.	35.4%***	2.7	
RATONES	12 h.p.i.	18.4%***	1.9	

INFECTADOS + PIOGLITAZONA	24 h.p.i.	15.5%***	1.8	67.6%
	36 h.p.i.	13.7%**	1.7	69.2%
	48 h.p.i.	12.5%**	1.6	64.69%

(\*) tomando como 100% la infección en los ratones infectados no tratados  
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) con n=4.

Al evaluar las proteínas no estructurales NSP4 y NSP5 se observa una tendencia similar: a las 12, 24, 36 y 48 h.p.i., los ratones infectados y tratados con pioglitazona disminuyeron 90.2%, 77.1%, 75.6% y 78.5%, tomando como 100% la infección en los ratones infectados no tratados. Para NSP5 los ratones infectados y tratados con pioglitazona disminuyeron 33.3%, 77.1%, 74.8% y 87.1%. (Figura 5-7B). Los resultados son el promedio de dos experimentos cada uno se midió por duplicado y del conteo de 15 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada h.p.i. evaluada y para cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) para NSP4 y NSP5 con n=4. (Tabla 5-3).

**Tabla 5-3:** Modelo *in vivo*: porcentajes de infección de antígenos virales de proteínas no estructurales NSP4 y NSP5 de Rotavirus evaluadas mediante inmunocitoquímica.

GRUPOS DE RATONES	% DE INFECCIÓN (Antígenos virales, evaluando proteínas no estructurales NSP4)		D.E. (*)	% DE DISMINUCIÓN DE LA INFECCIÓN(**)	% DE INFECCIÓN (Antígenos virales, evaluando proteínas no estructurales NSP5)		D.E. (*)	% DISMINUCIÓN DE LA INFECCIÓN (**)		
RATONES NO INFECTADOS	0%		0		0%		0			
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA	0% NS		0		0% NS		0			
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	47.1% ***	3.07		12 h.p.i.	73.2% ***	3.83			
	24 h.p.i.	42.9% ***	2.93		24 h.p.i.	47.1% ***	3.07			
	36 h.p.i.	43.4% ***	2.95		36 h.p.i.	33.7% ***	2.60			
	48 h.p.i.	49.4% ***	3.14		48 h.p.i.	41.8% ***	2.89			
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	4.6% ***	1.38		90.2%	12 h.p.i.	48.8% ***		3.13	33.3%
	24 h.p.i.	9.8% ***	1.40		77.1%	24 h.p.i.	10.8% ***		1.47	77.1%
	36 h.p.i.	10.6% ***	1.46		75.6%	36 h.p.i.	8.5% ***		1.31	74.8%
	48 h.p.i.	10.6% ***	1.43		78.5%	48 h.p.i.	5.4% ***		1.04	87.1%

(\*) Desviación Estándar  
(\*\*) Tomando como 100% la infección en los ratones infectados no tratados  
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) para NSP4 y NSP5 con n=4.

Otro método para evaluar la infección fue la técnica de ELISA. Con este método se observó la misma tendencia de disminución en la expresión de las proteínas estructurales virales en los ratones infectados y tratados con pioglitazona en comparación con los ratones a los cuales solo se les administro rotavirus (disminución de 0%, 73.8%, 55.6% y 56% tomando como 100% la infección en los ratones infectados no tratados) (Figura 5-7C). Los resultados, luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno medido por triplicado, luego de restar los valores de los controles negativos. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 76.87mg/ml de proteína total. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P < 0.0001$ , Ratones Inf 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$ ) con un  $n=6$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados (Tabla 5-4).

**Tabla 5-4:** Ensayo ELISA modelo *in vivo*: absorbancia de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales.

GRUPOS DE RATONES	ABSORBANCIA DE (Antígenos virales, evaluando proteínas estructurales)	VARIANZA	% DE DISMINUCIÓN DE LA INFECCION*
RATONES NO INFECTADOS	0	0	
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA	0NS	0	
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	0.471***	0.094
	24 h.p.i.	0.591***	0.118
	36 h.p.i.	0.383***	0.055
	48 h.p.i.	0.348***	0.070
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	0.479NS	0.096
	24 h.p.i.	0.155***	0.031
	36 h.p.i.	0.170***	0.024
	48 h.p.i.	0.153***	0.031
*tomando como 100% la infección en los ratones infectados no tratados. Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio $P < 0.0001$ , Ratones Inf 12 h.p.i. $P < 0.0001$ , 24 h.p.i. $P < 0.0001$ , 36 h.p.i. $P < 0.0001$ y 48 h.p.i. $P < 0.0001$ ) y de color rojo comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio 12 h.p.i. $P < 0.0001$ , 24 h.p.i. $P < 0.0001$ , 36 h.p.i. $P < 0.0001$ y 48 h.p.i. $P < 0.0001$ ) con $n=6$ .			

Al analizar el experimento en el modelo *in vitro*, los resultados fueron similares a los encontrados en el modelo *in vivo*. Al estudiarlas mediante inmunocitoquímica mostró que las vellosidades infectadas a las que se les administró pioglitazona disminuyó la presencia de antígenos virales, comparadas con aquellas que solamente fueron infectadas (Figura 5-7D). Para determinar el porcentaje de infección para cada uno de los grupos de vellosidades se realizó un conteo de las células de vellosidades infectadas y de aquellas a las que se le administró pioglitazona. Para el conteo se utilizó el programa ImageJ (plugins, cell counter).

*In vitro*, las vellosidades aisladas se infectaron y se trataron o no con pioglitazona, cosechándose a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h.p.i. Al examinar las proteínas estructurales del virus en las vellosidades infectadas y tratadas la infección disminuyó 0%, 57.3%, 53.5%, 49.7%, 36.4%, 44.3% y 54.3%, tomando como 100% la infección de las vellosidades no tratadas. Al examinar las proteínas no estructurales NSP4 y NSP5 el resultado fue similar a lo anterior. Para NSP4, las vellosidades infectadas y tratadas con pioglitazona disminuyeron 0%, 75.7%, 81.7%, 81.7%, 82.9%, 67.3% y 57.3%. Para NSP5, disminuyeron 0%, 84.7%, 62.8%, 53.9%, 49.6%, 59.9% y 79.3% (Figura 5-7E). Los resultados son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 15 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada h.p.i. evaluada y para cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=0.0046, Ratones Inf 0 h.p.i. P=0.0046, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para las proteínas estructurales; Ratones no Inf+Pio P=0.0308, Ratones Inf 0 h.p.i. P=0.0308, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para la proteínas no estructural NSP4 y Ratones no Inf+Pio P=0.0580, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.0580, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para la proteína no estructural NSP5; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.0046, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para las proteínas estructurales; 0 h.p.i. P=0.0308, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para la proteínas no estructural NSP4 y 0 h.p.i. P=0.0580, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para la proteína no estructural NSP5 con un n=4 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados (Tabla 5-5).

**Tabla 5-5:** Inmunocitoquímica del modelo *in vitro*: porcentajes de infección de antígenos virales de proteínas estructurales y no estructurales NSP4 y NSP5 de Rotavirus

GRUPOS DE VELLOSIDADES AISLADAS	PORCENTAJE DE INFECCIÓN (Antígenos virales, evaluando proteínas estructurales)	DESVIACIÓN ESTANDAR	% DE DISMINUCIÓN DE LA INFECCION(*)
VELLOSIDADES AISLADAS NO INFECTADAS	0%	0	
VELLOSIDADES AISLADAS NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0% <b>NS</b>	0	
VELLOSIDADES AISLADAS INFECTADAS	0 h.p.i.	0.5%*	0.3
	2 h.p.i.	37.2%***	2.73
	4 h.p.i.	30.1%***	2.45
	6 h.p.i.	33.4%***	2.59
	8 h.p.i.	38.5%***	2.78
	10 h.p.i.	31,8%***	2.52
	12 h.p.i.	28.9%***	2.40
VELLOSIDADES AISLADAS INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	0.5% <b>NS</b>	0.3
	2 h.p.i.	15.9%***	1.78
	4 h.p.i.	14.0%***	1.67
	6 h.p.i.	16.8%***	1.83
	8 h.p.i.	24.5%***	2.21
	10 h.p.i.	17.7%***	1.88

	12 h.p.i.	13.2%***	1.62	54.3%
(*) tomando como 100% la infección en las vellosidades infectadas no tratadas Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. <b>Color azul</b> comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=0.0046, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.0046, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de <b>color rojo</b> comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.0046, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=4.				

GRUPOS DE VELLOSIDADES	% DE INFECCIÓN (Antígenos virales, evaluando proteínas no estructurales NSP4)		D.E. (*)	% DE DISMINUCIÓN (**)	% DE INFECCIÓN (Antígenos virales, evaluando proteínas no estructurales NSP5)		D.E. (*)	% DE DISMINUCIÓN (**)
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0%		0		0%		0	
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0%NS		0		0%NS		0	
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	0.4%NS	0.32		0 h.p.i.	0.3%NS	0.27	
	2 h.p.i.	42%***	2.65		2 h.p.i.	44.5%***	2.72	
	4 h.p.i.	46.1%***	2.77		4 h.p.i.	49.7%***	2.88	
	6 h.p.i.	44.3%***	2.52		6 h.p.i.	51.8%***	2.72	
	8 h.p.i.	42.8%***	2.93		8 h.p.i.	55.4%***	3.33	
	10 h.p.i.	48.7%***	3.12		10 h.p.i.	51.6%***	3.21	
	12 h.p.i.	48.3%***	2.84		12 h.p.i.	51.6%***	2.93	
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	0.4%NS	0.32	0%	0 h.p.i.	0.3%NS	0.27	0%
	2 h.p.i.	10.2%***	1.42	75.7%	2 h.p.i.	6.8%***	1.17	84.7%
	4 h.p.i.	8.5%***	1.19	81.7%	4 h.p.i.	18.5%***	1.76	62.8%
	6 h.p.i.	8.1%***	1.07	81.7%	6 h.p.i.	23.9%***	1.85	53.9%
	8 h.p.i.	7.3%***	1.21	82.9%	8 h.p.i.	27.9%***	2.36	49.6%
	10 h.p.i.	15.9%***	1.63	67.3%	10 h.p.i.	20.7%***	1.86	59.9%
12 h.p.i.	20.6%***	1.85	57.3%	12 h.p.i.	10.7%***	1.34	79.3%	
(*) Desviación Estándar (**)Tomando como 100% la infección en los ratones infectados no tratados Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. <b>Color azul</b> comparación vellosidades no infectadas e infectadas (Ratones no Inf+Pio P=0.0308, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.0308, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para NSP4 y Ratones no Inf+Pio P=0.0580, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.0580, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para NSP5) y de <b>color rojo</b> comparación vellosidades infectadas e infectadas y tratadas con pioglitazona (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.0308, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para NSP4 y 0 h.p.i. P=0.0580, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 para NSP5) con n=4.								

La infección en el modelo *in vitro* también se evaluó mediante la técnica de ELISA. El resultado muestra disminución de la expresión de las proteínas virales en las vellosidades infectadas y tratadas con pioglitazona respecto a las vellosidades infectadas sin tratamiento (disminución de 0%, 76.1%, 81.2%, 70.3%, 44.4%, 57.5% y 55.1%) tomando como 100% la infección en los ratones infectados no tratados) (Figura 5-7F). Los resultados, luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno medido por triplicado, luego de restar los controles negativos. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 18.76mg/ml de proteína total. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P:



Ratones no Inf+Pio  $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 0 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 2 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 4 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 6 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 8 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 10 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 2 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 4 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 6 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 8 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 10 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 12 h.p.i.  $P < 0.0001$  con un  $n=6$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados (Tabla 5-6).

**Tabla 5-6:** ELISA en el modelo *in vitro*: absorbancia de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales

GRUPOS DE VELLOSIDADES	ABSORBANCIA DE (Antígenos virales, evaluando proteínas estructurales)	VARIANZA	% DE DISMINUCIÓN DE LA INFECCION(*)
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0	0	
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0NS	0	
VELLOSIDADES INFECTADOS	0 h.p.i.	0.028***	0.004
	2 h.p.i.	0.213***	0.016
	4 h.p.i.	0.212***	0.016
	6 h.p.i.	0.218***	0.017
	8 h.p.i.	0.262***	0.023
	10 h.p.i.	0.227***	0.018
	12 h.p.i.	0.178***	0.011
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	0.029NS	0%
	2 h.p.i.	0.127***	76.1%
	4 h.p.i.	0.121***	81.2%
	6 h.p.i.	0.135***	70.3%
	8 h.p.i.	0.190***	44.4%
	10 h.p.i.	0.154***	57.5%
	12 h.p.i.	0.135***	55.1%
(*) Tomando como 100% la infección en las vellosidades infectadas no tratados. Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 0 h.p.i. $P < 0.0001$ , 2 h.p.i. $P < 0.0001$ , 4 h.p.i. $P < 0.0001$ , 6 h.p.i. $P < 0.0001$ , 8 h.p.i. $P < 0.0001$ , 10 h.p.i. $P < 0.0001$ y 12 h.p.i. $P < 0.0001$ ) y de color rojo comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. $P < 0.0001$ , 2 h.p.i. $P < 0.0001$ , 4 h.p.i. $P < 0.0001$ , 6 h.p.i. $P < 0.0001$ , 8 h.p.i. $P < 0.0001$ , 10 h.p.i. $P < 0.0001$ y 12 h.p.i. $P < 0.0001$ ) con $n=6$ .			

Para este experimento, se hizo viabilidad de las vellosidades para todas las horas evaluadas (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h.p.i.) utilizando el colorante azul tripán. El resultado fue 98% de vellosidades vivas en promedio para todas las horas (Figura 5-7G). La evaluación se hizo por duplicado.

**Figura 5-7:** En las vellosidades procedentes de ratones infectados *in vivo* o en las vellosidades aisladas del intestino delgado, infectadas *in vitro*, se disminuye la infección del rotavirus ECwt al tratarlos con pioglitazona. **A.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver tamaño real anexo A) **B.** Conteo del porcentaje de infección de proteínas estructurales y no estructurales de rotavirus, evaluadas por inmunocitoquímica modelo *in vivo*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ. **C.** ELISA de la expresión de proteínas estructurales de rotavirus. Modelo *in vivo*. **D.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona *in vitro* (Modelo *in vitro*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver





## **5.2. En las vellosidades procedentes de ratones infectados *in vivo* o en las vellosidades aisladas del intestino delgado e infectadas *in vitro*, se aumenta la expresión de PPAR $\gamma$ con la infección del rotavirus ECwt y al tratarlos con pioglitazona se normaliza**

Para establecer si la expresión del factor de transcripción celular PPAR $\gamma$ , cambia en aquellos ratones que fueron infectados o infectados y tratados con pioglitazona, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, ELISA, citometría de flujo y Western blot. Como control se examinó la expresión de PPAR $\gamma$  en ratones no infectados y no infectados pero tratados con pioglitazona.

En el modelo *in vivo*, fotografías representativas de cada una de las horas evaluadas mostraron que los ratones infectados a los que se les administró pioglitazona disminuye la presencia de antígenos virales, respecto a los que solamente fueron infectados; al realizar el análisis en las mismas láminas, por medio de inmunofluorescencia, se observa que la intensidad de la fluorescencia disminuye en los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona en comparación con los ratones que solo fueron infectados con rotavirus. Como control de la fluorescencia basal se utilizaron los ratones no infectados y ratones no infectados pero que se les administró pioglitazona (Figura 5-8A).

Para determinar la expresión de la proteína celular PPAR $\gamma$  en el modelo *in vivo*, mediante inmunofluorescencia, en cada uno de los tratamientos, se realizó un conteo de las células en las vellosidades procedentes de ratones no infectados, no infectados y tratados con pioglitazona, infectados e infectados y tratados con pioglitazona, por medio del programa ImageJ (plugins, cell counter). Se encontró una expresión basal de PPAR $\gamma$  en las células de las vellosidades procedentes de ratones no infectados de 45.7%; los ratones no infectados y tratados con pioglitazona tuvieron una expresión de la proteína de 59.0%. A las 12, 24, 36 y 48 h.p.i. se observa que en los ratones infectados y tratados con pioglitazona tienen una expresión de la proteína de 54.0%, 48.1%, 46.6% y 47.8% observándose una disminución en comparación con los ratones infectados que tienen una expresión de 70.2%, 63%, 60% y 65.1% (Figura 5-8B). Los resultados mostrados son de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada hora post-infección evaluada, por cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001 con un n=4 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados. (Tabla5-7).

Sobre las mismas láminas se realizó la fluorescencia total corregida (CTCF) para cada uno de los grupos de ratones por medio del programa Image J (Analyze, measure). Para esto, se aplicó la siguiente fórmula: CTCF= Densidad integrada- (Área seleccionada de la célula X medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia). Se observó en los ratones no infectados una fluorescencia de 2'641.027, en los ratones no infectados y tratados con pioglitazona de 3'178.227. A las 12, 24, 36 y 48 h.p.i. los ratones infectados y tratados con pioglitazona tuvieron una fluorescencia de 3'579.881, 4'001.613, 3'192.007 y 2'855.686 y los ratones infectados de 5'555.373, 3'856.410, 3'248.426 y 3'408.808. (Figura 5-8C). Este resultado fue tomado del

promedio de lectura 15 células por fotografía de un total de 10 fotografías tomadas por grupo de ratón, por hora post-infección evaluada.

**Tabla 5-7:** Porcentajes de células positivas para PPAR $\gamma$  inmunofluorescencia modelo *in vivo*

GRUPOS DE RATONES		PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA PPAR $\gamma$	DESVIACIÓN ESTANDAR
RATONES NO INFECTADOS		45.7%	3.02
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA		59.0%***	3.43
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	70.2%***	3.75
	24 h.p.i.	63%***	3.55
	36 h.p.i.	60%***	3.47
	48 h.p.i.	65.1%***	3.61
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	54.0%***	3.29
	24 h.p.i.	48.1%***	3.10
	36 h.p.i.	46.6%***	3.05
	48 h.p.i.	47.8%***	3.09

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e infectados (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) y de color rojo comparación ratones infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) con n=4.

La expresión de la proteína celular también se evaluó mediante la técnica de ELISA en los mismos tiempos (12, 24, 36 y 48 h.p.i.). Se observó disminución de la expresión de la proteína en los ratones infectados y tratados con pioglitazona en comparación a los ratones infectados sin tratamiento (Figura 5-8B). Los resultados, luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno medido por triplicado, luego de restar el control negativo. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 76.87mg/ml de proteína total. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001 con un n=6 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados (Tabla 5-8).

**Tabla 5-8:** ELISA en el modelo *in vivo*: absorbancia de la proteína PPAR $\gamma$

GRUPOS DE RATONES		ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA PPAR $\gamma$	VARIANZA
RATONES NO INFECTADOS		0.535	0.076
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA		0.866**	0.124
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	1.785***	0.255
	24 h.p.i.	0.923***	0.132
	36 h.p.i.	0.618 NS	0.088
	48 h.p.i.	0.541 NS	0.077
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	0.938***	0.134
	24 h.p.i.	0.843NS	0.120
	36 h.p.i.	0.521NS	0.074
	48 h.p.i.	0.543 NS	0.078

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de

ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados (Ratones no Inf+Pio  $P<0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i.  $P<0.0001$ , 24 h.p.i.  $P<0.0001$ , 36 h.p.i.  $P<0.0001$  y 48 h.p.i.  $P<0.0001$ ) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i.  $P<0.0001$ , 24 h.p.i.  $P<0.0001$ , 36 h.p.i.  $P<0.0001$  y 48 h.p.i.  $P<0.0001$ ) con  $n=6$ .

La expresión de PPAR $\gamma$  igualmente se evaluó mediante la técnica de citometría de flujo. Para correlacionar la infección viral con la expresión de PPAR $\gamma$ , se evaluó simultáneamente el antígeno viral y PPAR $\gamma$ . Se encontró la misma tendencia a lo descrito con otras metodologías. Las vellosidades procedentes de ratones no infectados fueron positivas para PPAR $\gamma$  en 0.2%, y el antígeno viral lo fue en 5.8%. En las células procedentes de ratones infectados la expresión de PPAR $\gamma$  fue de 25.6% y la detección de antígenos virales fue de 23.6%. En las células procedentes de ratones infectados y tratados con pioglitazona durante 12, 24, 36 y 48 h.p.i. La expresión de PPAR $\gamma$  fue de 20.3%, 13.0%, 28.3% y 6.6% y el porcentaje de los antígenos virales fue de 30.7%, 21.0%, 7.5% y 0.1% (Figura 5-8D). Como controles de la técnica se utilizaron células sin ningún anticuerpo; células con un anticuerpo primario no relacionado, más los anticuerpos secundarios; y células con los anticuerpos secundarios, sin anticuerpo primario.

En el modelo *in vitro*, vellosidades aisladas y luego infectadas, tratadas o no con pioglitazona se emplearon para realizar inmunofluorescencia, ELISA y western blot con el fin de evaluar la expresión de PPAR $\gamma$ . Fotografías representativas de cada una de las horas evaluadas mostraron que vellosidades infectadas que se les administró pioglitazona disminuye la presencia de antígenos virales, comparados con aquellos que solamente fueron infectadas; al realizar el análisis en los mismos campos microscópicos por medio de inmunofluorescencia se observa que la intensidad de la fluorescencia disminuye en las vellosidades que fueron infectadas y tratadas con pioglitazona en comparación con las vellosidades que solo fueron infectadas con rotavirus, como control de la fluorescencia basal se utilizaron vellosidades no infectadas y vellosidades no infectadas pero que se les administro pioglitazona (Figura 5-8E). Para el conteo celular se empleó el programa ImageJ (plugins, cell counter). El resultado indicó, en vellosidades no infectadas, positividad para PPAR $\gamma$  de 21.8%, en vellosidades no infectadas y tratadas con pioglitazona fue de 56.8%, en vellosidades infectadas la expresión fue de 39.5%, 60.1%, 60.9%, 62.8%, 64.7%, 65.8% y 52.1%, para 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h.p.i., respectivamente. En vellosidades infectadas y tratadas con pioglitazona, la expresión fue de 33.5%, 55.9%, 55.5%, 51.9%, 55.7%, 56.4% y 48.9% para los mismos tiempos de tratamiento (Tabla 5-9). Los resultados son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 15 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada h.p.i. evaluada y para cada tipo de proteína (Figura 5-8F). En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P<0.0001$ , Ratones Inf: 0 h.p.i.  $P<0.0001$ , 2 h.p.i.  $P<0.0001$ , 4 h.p.i.  $P<0.0001$ , 6 h.p.i.  $P<0.0001$ , 8 h.p.i.  $P<0.0001$ , 10 h.p.i.  $P<0.0001$  y 12 h.p.i.  $P<0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i.  $P<0.0001$ , 2 h.p.i.  $P<0.0001$ , 4 h.p.i.  $P<0.0001$ , 6 h.p.i.  $P<0.0001$ , 8 h.p.i.  $P<0.0001$ , 10 h.p.i.  $P<0.0001$  y 12 h.p.i.  $P<0.0001$  con un  $n=4$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados.

**Tabla 5-9:** Porcentajes de células positivas para PPAR $\gamma$  inmunofluorescencia modelo *in vitro*

GRUPOS DE VELLOSIDADES	PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA PPAR $\gamma$	DESVIACIÓN ESTANDAR
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	21.8%	2.09
VELLOSIDADES NO INFECTADAS +	56.8%***	3.37

PIOGLITAZONA			
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	39.5%***	2.81
	2 h.p.i.	60.1%***	3.47
	4 h.p.i.	60.9%***	3.49
	6 h.p.i.	62.8%***	3.54
	8 h.p.i.	64.7%***	3.60
	10 h.p.i.	65.8%***	3.63
	12 h.p.i.	52.1%***	3.23
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	33.5%*	2.59
	2 h.p.i.	55.9%NS	3.34
	4 h.p.i.	55.5%NS	3.33
	6 h.p.i.	51.9%***	3.22
	8 h.p.i.	55.7%**	3.34
	10 h.p.i.	56.4%**	3.36
	12 h.p.i.	48.9%*	3.13
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de color rojo comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=4.			

En este experimento también se analizó PPAR $\gamma$  mediante la técnica de ELISA en los mismos tiempos evaluados (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h.p.i.). Se observó la misma tendencia de disminución de la expresión de esta proteína en las vellosidades infectadas y tratadas con pioglitazona en comparación con las vellosidades que solo fueron infectadas (Figura 5-8F). Los resultados, luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno medido por triplicado. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 18.76mg/ml de proteína total. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 con un n=6 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados (Tabla 5-10).

**Tabla 5-10:** ELISA de modelo *in vitro*: absorbancia de la proteína PPAR $\gamma$

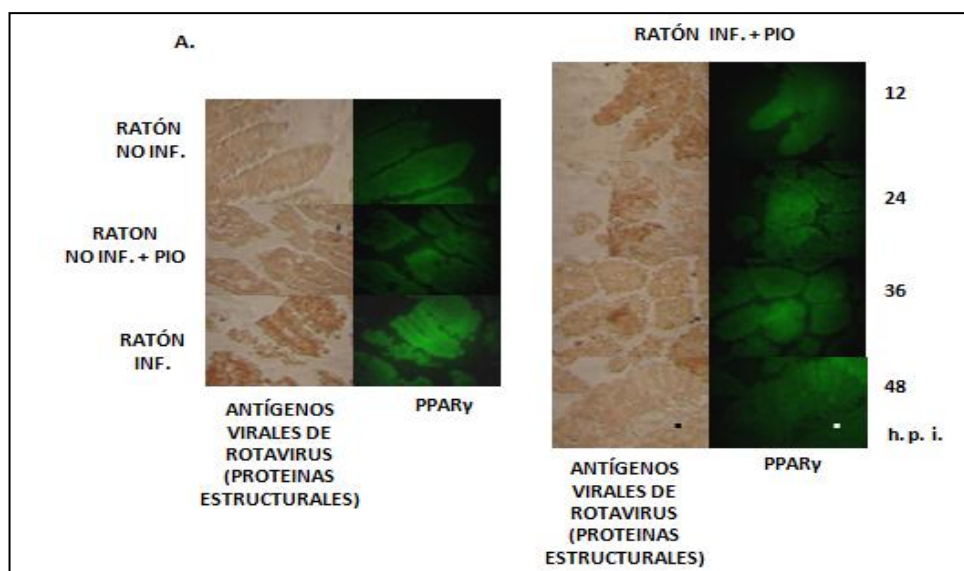
GRUPOS DE VELLOSIDADES	ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA PPAR $\gamma$		VARIANZA
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0.287		0.041
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0.525***		0.075
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	0.374*	0.053
	2 h.p.i.	0.406**	0.058
	4 h.p.i.	0.411**	0.059
	6 h.p.i.	0.359NS	0.051
	8 h.p.i.	0.417**	0.060
	10 h.p.i.	0.502***	0.072

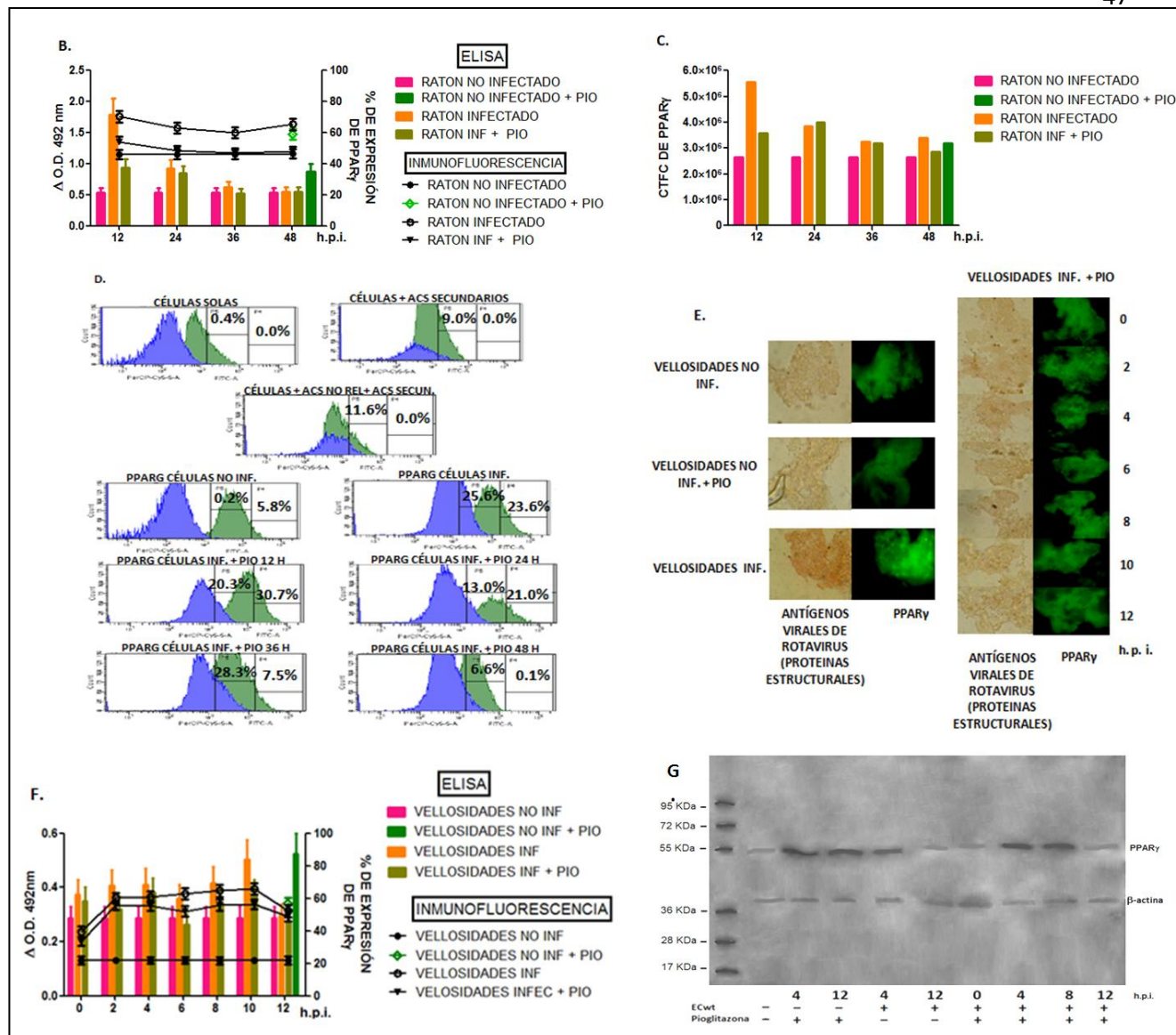


VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	0.296 <b>NS</b>	0.042
	0 h.p.i.	0.350 <b>NS</b>	0.050
	2 h.p.i.	0.321*	0.046
	4 h.p.i.	0.379 <b>NS</b>	0.054
	6 h.p.i.	0.264*	0.038
	8 h.p.i.	0.345 <b>NS</b>	0.049
	10 h.p.i.	0.375**	0.054
	12 h.p.i.	0.275 <b>NS</b>	0.039
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y <b>NS</b> (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. <b>Color azul</b> comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de <b>color rojo</b> comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=6.			

En el ensayo de Western blot se analizó la expresión de la proteína PPAR $\gamma$  a partir del lisado de vellosidades no infectadas, no infectadas y tratadas con pioglitazona, infectadas e infectadas y tratadas con pioglitazona *in vitro* a diferentes h.p.i. Se encontró una banda tenue en vellosidades no infectadas y una banda más fuerte en vellosidades solamente tratadas con pioglitazona. En vellosidades infectadas *in vitro* a las 4 y 12 h.p.i. se observa que la banda es más pronunciada respecto a las vellosidades que no fueron infectadas. En las vellosidades infectadas y tratadas con pioglitazona a las 0, 4, 8 y 12 h.p.i. se observa disminución en la intensidad y grosor de la banda, en la medida que aumenta el tiempo de tratamiento, en especial a las 12 h.p.i. (Figura 5-8G). Este resultado corrobora lo hallado mediante las técnicas de ELISA e inmunofluorescencia.

**Figura 5-8:** En las vellosidades procedentes de ratones infectados *in vivo* o en las vellosidades aisladas del intestino delgado, infectadas *in vitro*, se aumenta la expresión de PPAR $\gamma$  con la infección del rotavirus ECwt y al tratarlos con pioglitazona se normaliza. **A.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de PPAR $\gamma$  en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver tamaño real anexo C) **B.** ELISA y conteo del porcentaje de expresión de la proteína PPAR $\gamma$ , evaluada por inmunofluorescencia modelo *in vivo*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ. **C.** Cálculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ. Modelo *in vivo*. **D.** Citometría de flujo, expresión de los antígenos virales de color verde y expresión de la proteína celular PPAR $\gamma$  color azul. Modelo *in vivo*. **E.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de PPAR $\gamma$  en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona *in vitro* (Modelo *in vitro*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver tamaño real anexo D) **F.** ELISA y conteo del porcentaje de expresión de PPAR $\gamma$ , evaluadas por inmunofluorescencia modelo *in vitro*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ. **G.** Western blot, análisis de la expresión de PPAR $\gamma$ . Modelo *in vitro*.





### 5.3. PPAR $\gamma$ colocaliza aleatoriamente con los antígenos de rotavirus en vellosidades intestinales de ratones ICR infectadas con rotavirus y tratadas con pioglitazona

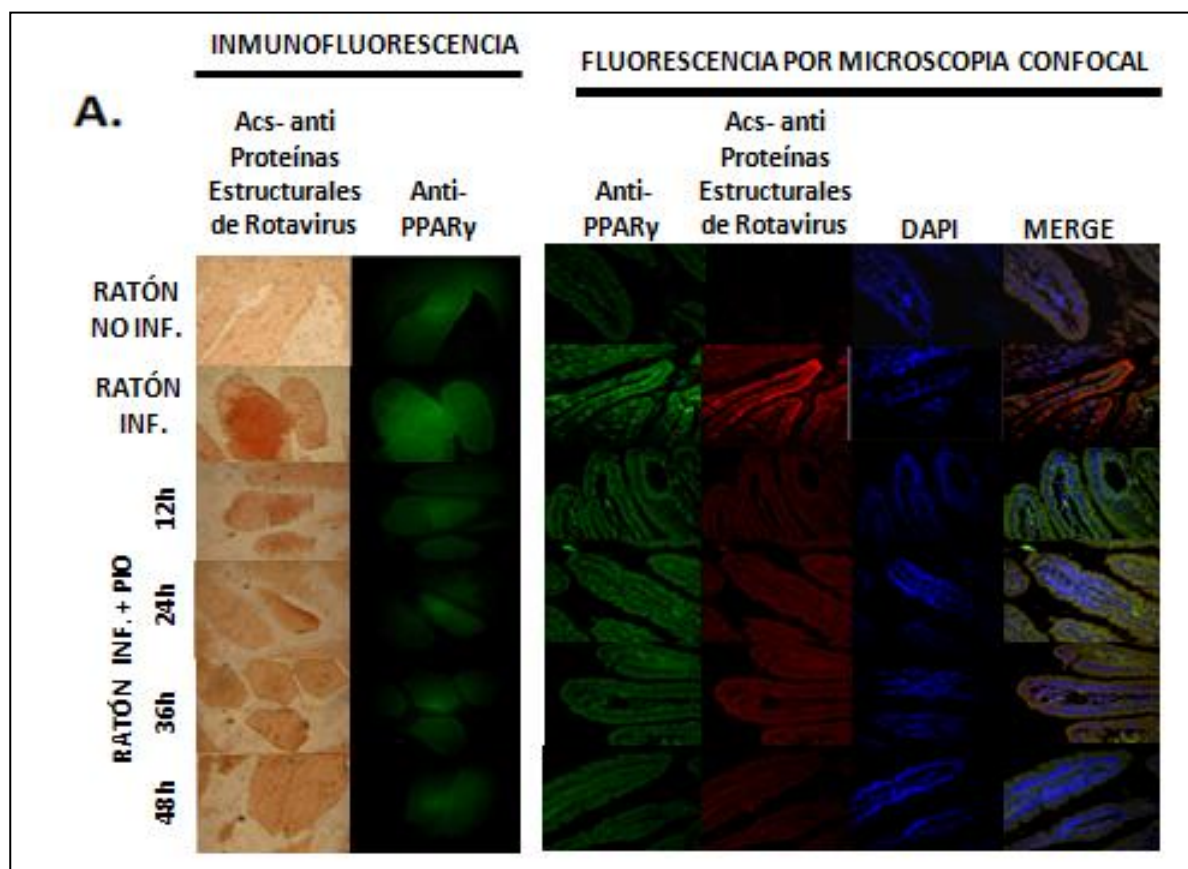
Se quiso determinar si al activar el receptor transcripcional PPAR $\gamma$  *in vivo*, altera la expresión de PPAR $\gamma$  o la infección de rotavirus, junto con su colocalización. El análisis de la fluorescencia de la microscopía confocal e inmunofluorescencia mostró que en los cortes histológicos de ratones a los que se les administró pioglitazona disminuyó la fluorescencia de antígenos virales y de PPAR $\gamma$ , en las diferentes h.p.i., respecto a los ratones infectados sin tratamiento, como se observa en las fotografías representativas de cada grupos de ratones (Figura 5-9A y 9C).

Los cortes histológicos fueron analizados por el programa Image J (plugins, colocalization Finder) y al calcular la colocalización entre las proteínas mediante el coeficiente de correlación de Pearson, se encontró un coeficiente de correlación de 0.1, entre PPAR $\gamma$  y los antígenos de rotavirus, para los

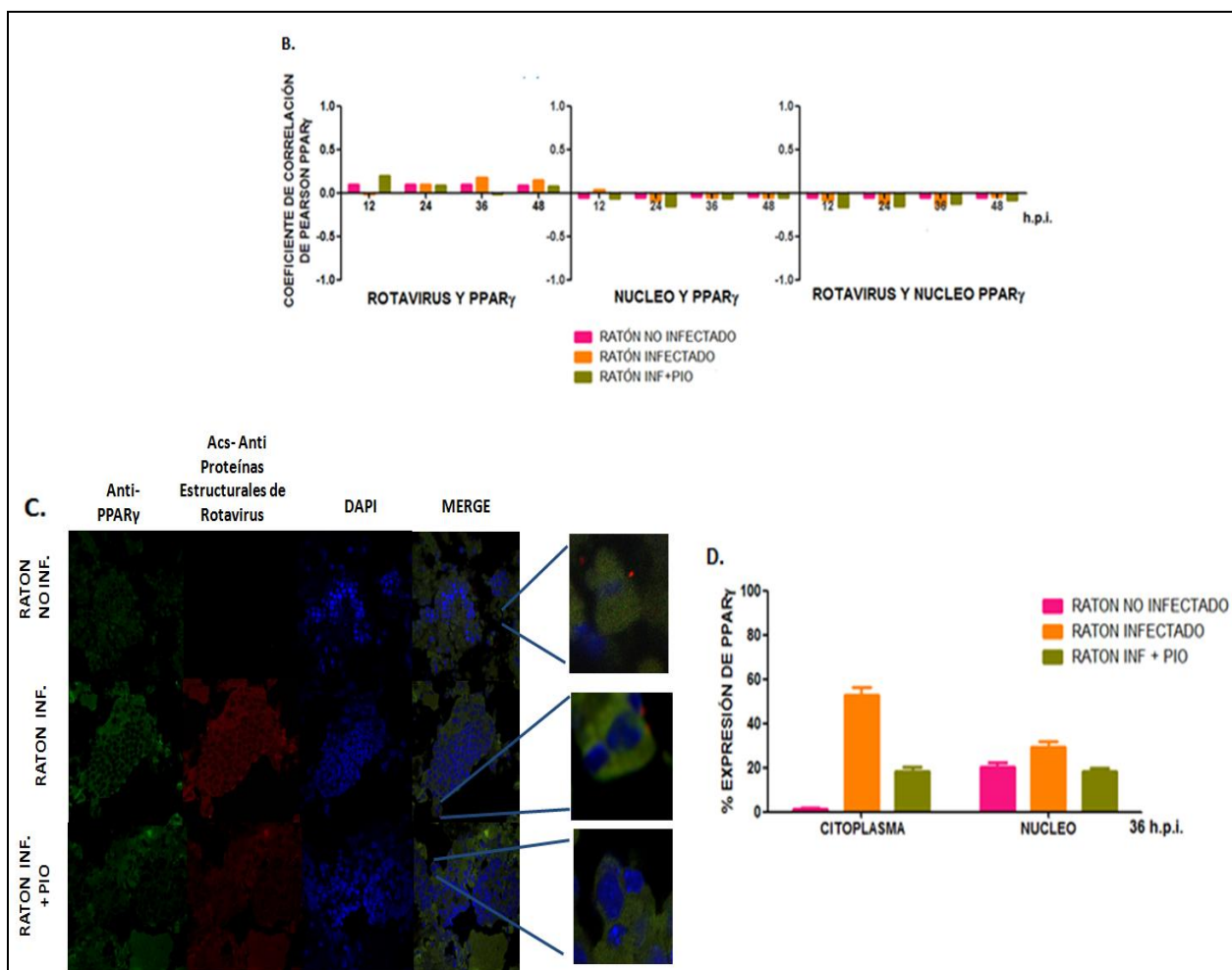
ratones que habían sido infectados con la cepa de rotavirus ECwt en los diferentes tiempos analizados (12, 24, 36 y 48 h.p.i.). El mismo valor se halló para los ratones infectados y tratados con pioglitazona, indicando una correlación aleatoria. PPAR $\gamma$  es un factor transcripcional que se encuentra en el citoplasma y/o en el núcleo, dependiendo de la actividad celular. Por esto, como control se analizó la colocalización entre el núcleo y la proteína PPAR $\gamma$  y entre el núcleo y los antígenos de rotavirus (se expresan solo en citoplasma) y el coeficiente de colocalización de Pearson fue de -0,1 en los tres grupos de ratones (no infectados, infectados y los tratados con pioglitazona) en las diferentes h.p.i., indicando que hay correlación aleatoria (Figura 5-9B).

Se tomaron fotografías en el microscopio confocal a vellosidades aisladas y se realizó un conteo de la fluorescencia por medio del programa Image J (plugins, cell counter). Se observó expresión de PPAR $\gamma$  de 1.5% en el citoplasma y 20.2% en núcleo, para los ratones no infectados (porcentaje de la fluorescencia positiva observada). En los ratones infectados con rotavirus ECwt se observó 53.0% en citoplasma y 29.5% en núcleo. En ratones infectados y tratados con pioglitazona se observó 18.4% en citoplasma y 18.1% en el núcleo (Figura 5-9D). Este análisis se hizo solo para las vellosidades de los ratones con 36 h.p.i. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas tuvieron un  $P < 0.0001$  y la comparación entre las vellosidades infectadas y las infectadas y tratadas con pioglitazona tuvieron un  $P < 0.0001$  para las diferentes h.p.i. con un  $n = 4$ , tanto en núcleo como en citoplasma.

**Figura 5-9:** PPAR $\gamma$  colocaliza aleatoriamente con los antígenos de rotavirus en vellosidades intestinales de ratones ICR infectadas con rotavirus y tratadas con pioglitazona. **A.** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular PPAR $\gamma$ . (Ver tamaño real anexo E) **B.** Calculo de la colocalización entre las proteínas mediante el coeficiente de correlación de Pearson, utilizando el programa ImageJ. **C.** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal de vellosidades aisladas para la detección y localización de PPAR $\gamma$ . (Ver tamaño real anexo F) **D.** Conteo de la expresión de PPAR $\gamma$  a nivel citoplasmático y nuclear, utilizando el programa ImageJ.







#### 5.4. La expresión de NF $\kappa$ B o NF $\kappa$ B-p disminuye en vellosidades intestinales aisladas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*.

Para determinar si al activar el receptor transcripcional PPAR $\gamma$ , *in vivo* o *in vitro*, se altera la expresión de proteínas celulares, relacionadas con PPAR $\gamma$  o con la infección de rotavirus, se evaluó mediante las técnicas de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, ELISA y citometría de flujo las proteínas celulares NF $\kappa$ B, NF $\kappa$ B-p (forma activa), I $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ , PDI, Hsc70 y Cox-2.

En el modelo *in vivo*, fotografías representativas de cada una de las horas evaluadas (12, 24, 36 y 48 h.p.i.) mostraron que los ratones a los que se les administró pioglitazona disminuye la presencia de antígenos virales, comparados con aquellos que solamente fueron infectados; al analizar NF $\kappa$ B en las mismas láminas por medio de inmunofluorescencia se observó que la intensidad de la fluorescencia disminuyó en los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona en comparación con los ratones que solo fueron infectados con rotavirus. Como control de la fluorescencia basal se utilizaron los ratones no infectados y ratones no infectados pero que se les administró pioglitazona (Figura 5-10A). Para el conteo, mediante inmunofluorescencia, de las células que expresan la proteína celular NF $\kappa$ B en el modelo *in vivo*, en cada uno de los

tratamientos, se empleó el programa ImageJ (plugins, cell counter). En las células de las vellosidades procedentes de ratones no infectados (expresión basal) la expresión de la proteína fue menor respecto a los ratones infectados (Figura 5-10B). Los resultados representan dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada hora post-infección evaluada, por cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$  con un  $n=4$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados (Tabla 5-11).

**Tabla 5-11:** Inmunofluorescencia del modelo *in vivo* del porcentajes de células positivas para NFκB

GRUPOS DE RATONES		PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA NFκB	DESVIACIÓN ESTANDAR
RATONES NO INFECTADOS		48.4%,	3.11
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA		46.3% <b>NS</b>	3.04
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	80.2% <b>***</b>	4.00
	24 h.p.i.	73.8% <b>***</b>	3.84
	36 h.p.i.	74.8% <b>***</b>	3.87
	48 h.p.i.	67.8% <b>***</b>	3.68
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	62.1% <b>***</b>	3.52
	24 h.p.i.	54.6% <b>***</b>	3.31
	36 h.p.i.	52.7% <b>***</b>	3.25
	48 h.p.i.	50.6% <b>***</b>	3.18
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: * **, *** y <b>NS</b> (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. <b>Color azul</b> comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i. $P < 0.0001$ , 24 h.p.i. $P < 0.0001$ , 36 h.p.i. $P < 0.0001$ y 48 h.p.i. $P < 0.0001$ ) y de <b>color rojo</b> comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. $P < 0.0001$ , 24 h.p.i. $P < 0.0001$ , 36 h.p.i. $P < 0.0001$ y 48 h.p.i. $P < 0.0001$ ) con $n=4$			

Al analizar en las mismas muestras el conteo de la fluorescencia total corregida (CTCF) para cada uno de los grupos de ratones por medio del programa Image J (Analyze, measure), se observó en los ratones no infectados una fluorescencia de 1'104.981 y en los ratones no infectados y tratados con pioglitazona de 1'228.446. A las 12, 24, 36 y 48 h.p.i. Se observó en los ratones infectados y tratados con pioglitazona una fluorescencia de 1'780.021, 1'493.143, 1'339.213 y 1'201.332 y en los infectados de 3'965.712, 2'197.294, 3'793.390 y 1'747.348. (Figura 5-10C). Este resultado fue tomado del promedio de lectura 15 células por fotografía en un total de 10 fotografías tomadas por grupo de ratón, por h.p.i. evaluada.

Para correlacionar la infección viral con la expresión de NFκB o NFκB-p, se evaluó simultáneamente el antígeno viral y NFκB o NFκB-p mediante la técnica de citometría de flujo. Se encontró la misma tendencia a lo descrito con otras metodologías. Las vellosidades procedentes de ratones no infectados fueron positivas para NFκB y NFκB-p en 0.2% y el antígeno viral lo fue en 5.8%. En las células procedentes de ratones infectados la expresión de NFκB fue de 18.9% y de NFκB-p fue de 27.2%; la detección de antígenos virales fue de 23.6%. En las células procedentes

de ratones infectados y tratados con pioglitazona durante 12, 24, 36 y 48 h.p.i., la expresión de NFκB fue de 13.1%, 14.1%, 24.5% y 6.8%; para NFκB-p fue de 13.1%, 14.1%, 27.4% y 6.0%, el porcentaje de los antígenos virales fue de 30.7%, 21.0%, 7.5% y 0.1% (Figura 5-10D y 10E). Como controles de la técnica se utilizaron células sin ningún anticuerpo; células con un anticuerpo primario no relacionado, más los anticuerpos secundarios; y células con los anticuerpos secundarios, sin anticuerpo primario.

En el modelo *in vitro*, vellosidades aisladas y luego infectadas, tratadas o no con pioglitazona se evaluó la expresión de NFκB mediante inmunofluorescencia. Para el conteo celular se empleó el programa ImageJ (plugins, cell counter). Fotografías representativas de cada una de las horas evaluadas mostraron que vellosidades infectadas a las que se les administró pioglitazona disminuye la presencia de antígenos virales, comparados con aquellos que solamente fueron infectadas; al realizar el análisis en las mismas láminas, por medio de inmunofluorescencia, se observó que la intensidad de la fluorescencia disminuye en las vellosidades que fueron infectadas y tratadas con pioglitazona en comparación con las vellosidades que solo fueron infectadas con rotavirus. Como control de la fluorescencia basal se utilizaron vellosidades no infectadas y vellosidades no infectadas pero que se les administro pioglitazona (Tabla 5-12). Los resultados son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 15 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada h.p.i. evaluada y para cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 con un n=4 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados (Figura 5-10G).

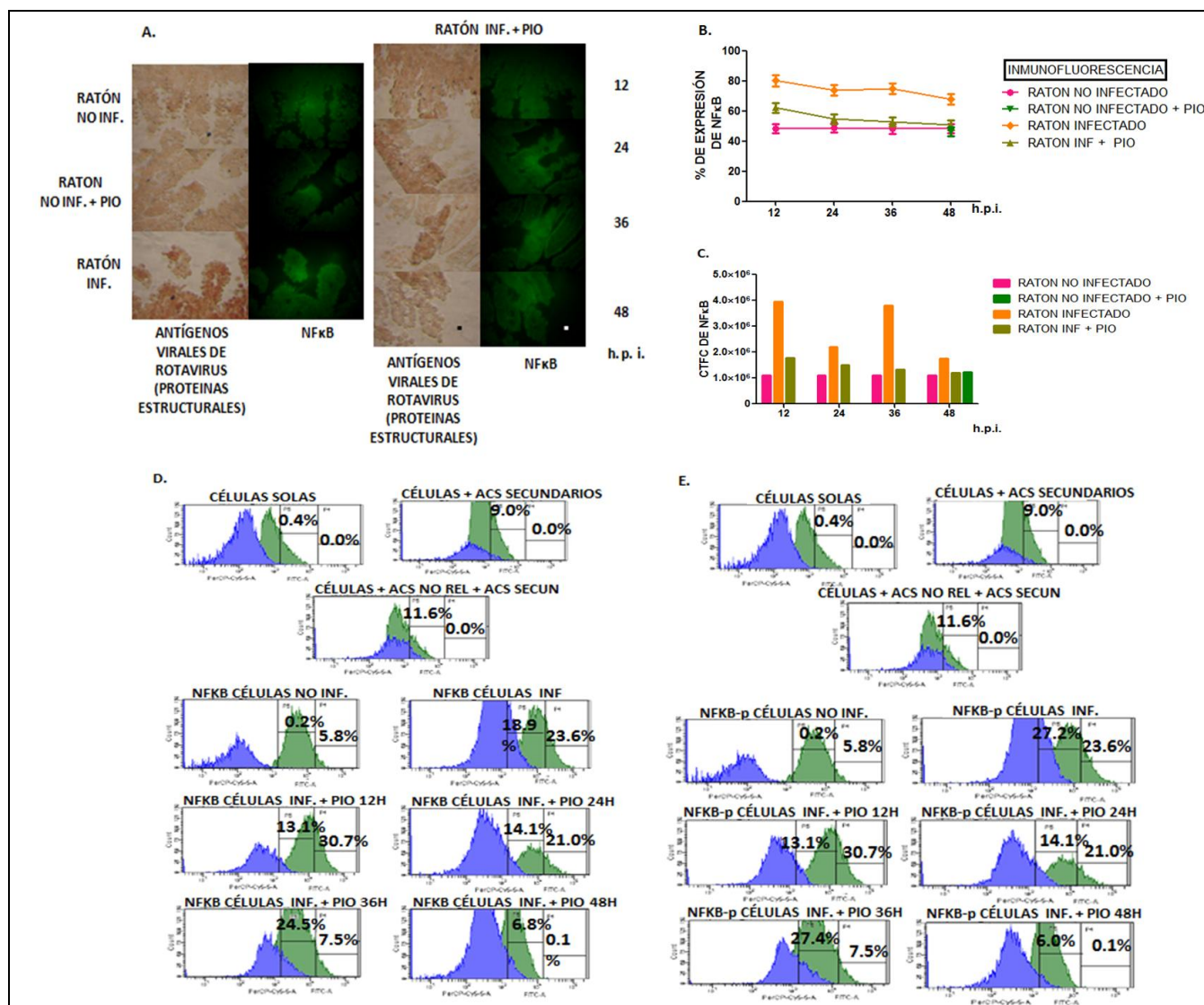
**Tabla 5-12:** Inmunofluorescencia del modelo *in vitro* del porcentajes de de células positivas para NFκB

GRUPOS DE VELLOSIDADES	PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA NFκB		DESVIACIÓN ESTANDAR
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	31.7%		2.78
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	24.4%**		2.21
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	39.5%**	3.05
	2 h.p.i.	65.5%***	3.52
	4 h.p.i.	56.2%***	4.26
	6 h.p.i.	64.5%***	3.48
	8 h.p.i.	60.4%***	3.47
	10 h.p.i.	65.4%***	3.47
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	62.0%***	4.06
	0 h.p.i.	31.9%**	2.78
	2 h.p.i.	52.9%***	3.14
	4 h.p.i.	50.8%***	3.38
	6 h.p.i.	53.0%***	3.13
	8 h.p.i.	52.8%***	3.25
	10 h.p.i.	54.4%***	3.13
	12 h.p.i.	44.5%***	3.12

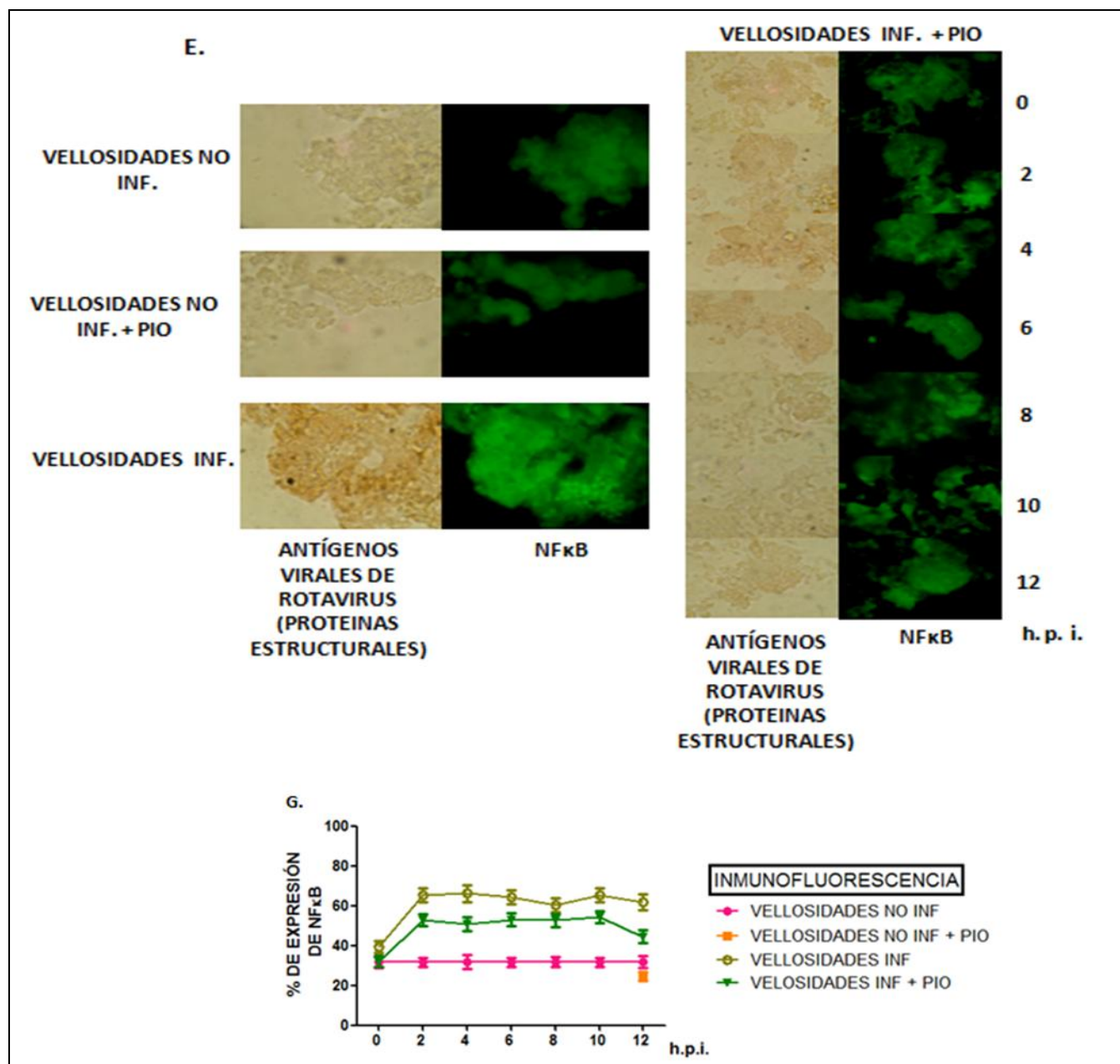
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e

infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=4

**Figura 5-10:** La expresión de NFκB o NFκB-p disminuye en vellosidades intestinales aisladas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el sistema *in vivo* e *in vitro*. **A.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de NFκB en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver tamaño real anexo G) **B.** Conteo del porcentaje de expresión de la proteína NFκB, evaluada por inmunofluorescencia modelo *in vivo*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ. **C.** Calculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ. Modelo *in vivo*. **D.** Citometría de flujo, expresión de los antígenos virales de color verde y expresión de la proteína celular NFκB color azul. Modelo *in vivo*. **E.** Citometría de flujo, expresión de los antígenos virales de color verde y expresión de la proteína celular NFκB-p color azul. Modelo *in vivo*. **F.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de NFκB en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona *in vitro* (Modelo *in vitro*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver tamaño real anexo H) **G.** Conteo del porcentaje de expresión de NFκB, evaluadas por inmunofluorescencia modelo *in vitro*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ.







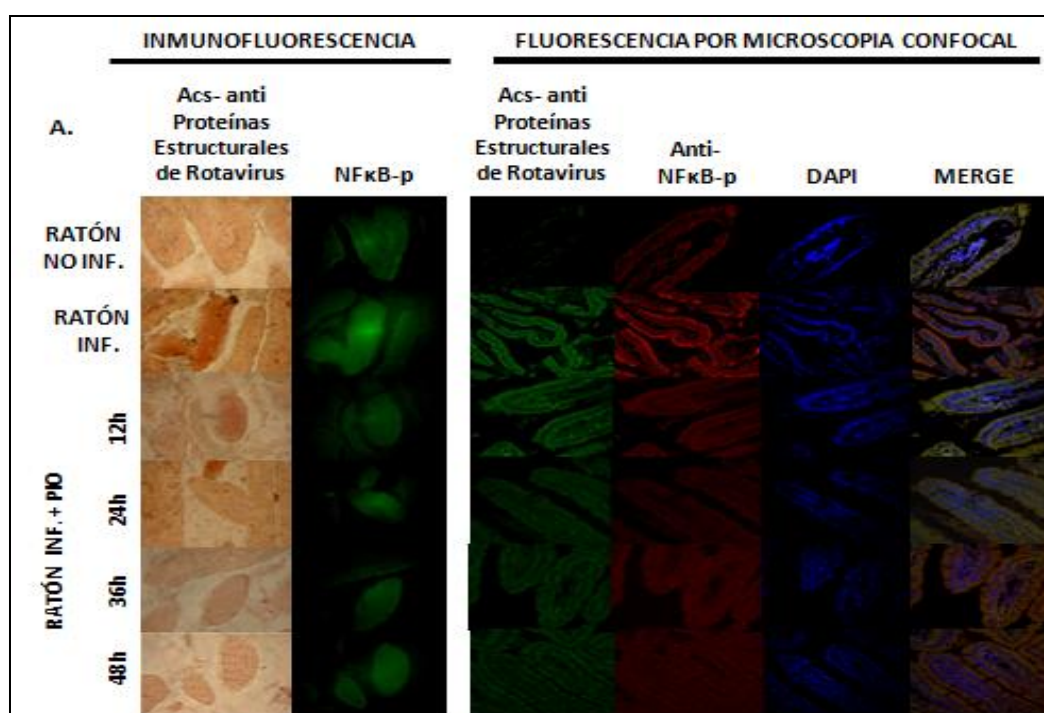
### 5.5. NFκB o NFκB-p colocaliza aleatoriamente con los antígenos de rotavirus en vellosidades intestinales de ratones ICR infectadas con rotavirus y tratadas con pioglitazona

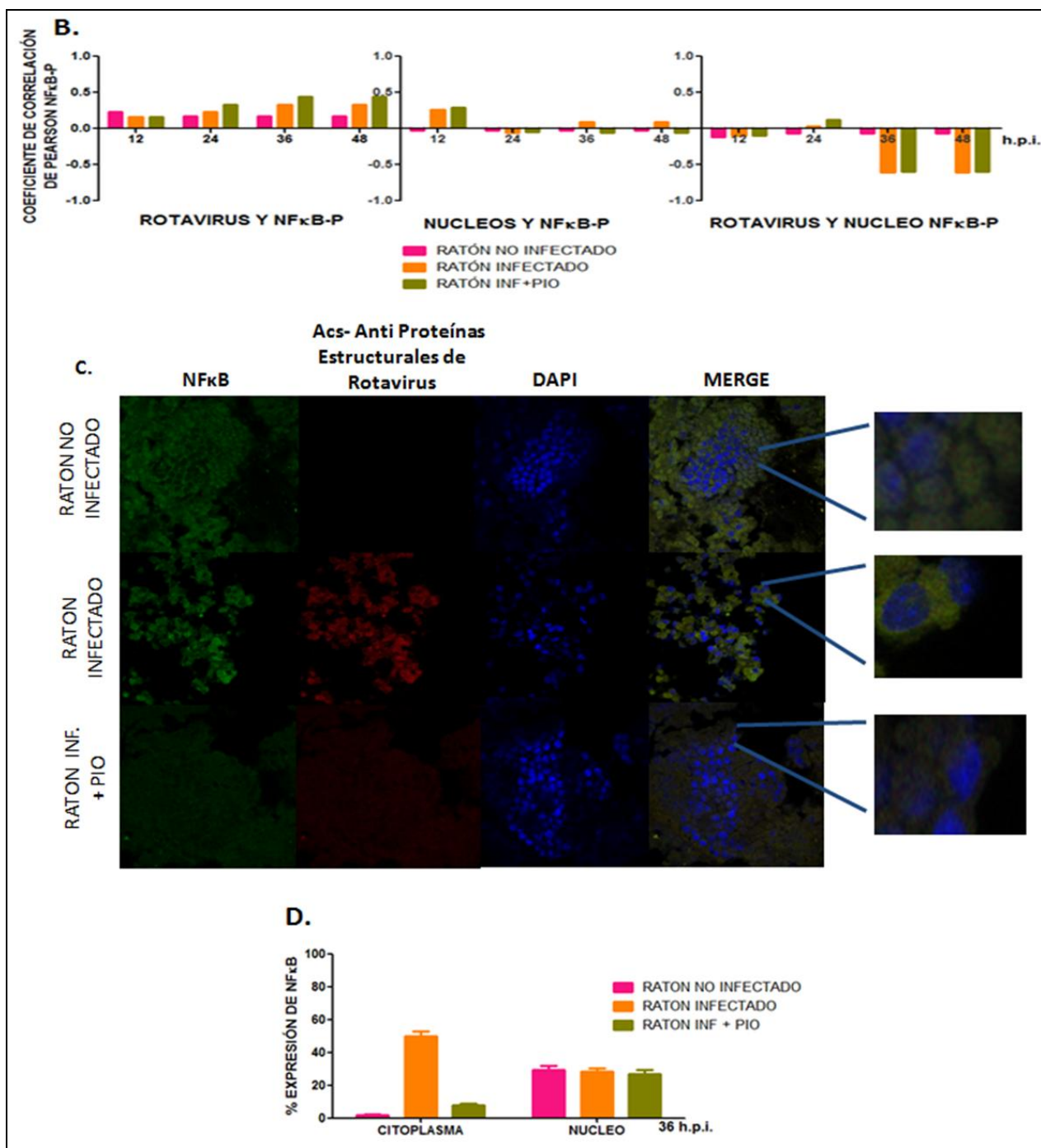
En el modelo *in vivo*, en cortes histológicos de duodeno de ratones experimentales, se encontró que al analizar los antígenos virales, por microscopía confocal o inmunofluorescencia, éstos disminuyeron en ratones a los que se les administró pioglitazona respecto a los no tratados. Igualmente disminuyó la intensidad de la fluorescencia, sugiriendo que disminuyó la expresión de NFκB y NFκB-p. Se muestran las fotografías representativas de cada uno de los grupos de ratones a diferentes h.p.i. (Figura 5-11A-C). Estas mismas láminas fueron analizadas por el programa ImageJ (plugins, colocalization Finder) para calcular la colocalización entre las proteínas virales y NFκB, según el coeficiente de correlación de Pearson. Se encontró un coeficiente de correlación de

0.3 para la colocalización entre NFκB y los antígenos de rotavirus en las vellosidades de los ratones que habían sido infectados y para los infectados y tratados con pioglitazona. Este valor corresponde, para ambos casos, a lo hallado en los diferentes tiempos analizados (12, 24, 36 y 48 h.p.i.), indicando una correlación aleatoria. NFκB es un factor transcripcional que se encuentra en el citoplasma y/o en el núcleo, dependiendo de la actividad celular. Por esto, como control se analizó la colocalización entre el núcleo y la proteína NFκB y entre el núcleo y los antígenos de rotavirus (se expresan solo en citoplasma) y el coeficiente de colocalización de Pearson fue de -0,2 en los tres grupos de ratones (no infectados, infectados y los tratados con pioglitazona) en las diferentes h.p.i., indicando que hay una correlación aleatoria (Figura 5-11B). Resultados realizados por duplicado.

Las fotografías tomadas en el confocal a vellosidades aisladas, se les realizó un conteo de la fluorescencia por medio del programa ImageJ (plugins, cell counter). Se observó la expresión de NFκB de 1.7% en el citoplasma y 29.5% en núcleo, para los ratones no infectados (conteo de la fluorescencia positiva observada). En los ratones infectados con rotavirus ECwt se observó 49.7% en citoplasma y 28.2% en núcleo. En ratones infectados y tratados con pioglitazona se observó 7.7% en citoplasma y 27% en el núcleo (Figura 5-11D). Este análisis se hizo solo para las vellosidades de los ratones con 36 h.p.i. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; en núcleo cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados tuvieron un  $P=0.3718$  y la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona tuvieron un  $P=0.3718$ , en citoplasma cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados tuvieron un  $P=<0.0001$  y la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona tuvieron un  $P=<0.0001$  con un  $n=4$ .

**Figura 5-11:** NFκB o NFκB-p colocaliza aleatoriamente con los antígenos de rotavirus en vellosidades intestinales de ratones ICR infectadas con rotavirus y tratadas con pioglitazona. **A.** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular NFκB-p. (Ver tamaño real anexo I) **B.** Cálculo de la colocalización entre las proteínas mediante el coeficiente de correlación de Pearson, utilizando el programa ImageJ. **C.** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal de vellosidades aisladas para la detección y localización de NFκB. (Ver tamaño real anexo J) **D.** Conteo de la expresión de NFκB a nivel citoplasmático y nuclear, utilizando el programa ImageJ.





### 5.6. La expresión de IκB cambia en las vellosidades intestinales extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona (modelo in vivo)

La proteína IκB inactiva a NFκB cuando se unen en el citoplasma. Por esto, se quiso analizar si cambia la expresión de la proteína IκB en las vellosidades de los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona, respecto a los infectados sin tratamiento. Se aislaron las vellosidades de estos ratones y se analizaron mediante la técnica de ELISA directo a las 12, 24, 36 y 48 h.p.i. Se encontró aumento de la expresión de la proteína en las vellosidades de los ratones infectados y

tratados con pioglitazona, respecto a los infectados sin tratamiento (Tabla 5-13), (Figura 5-12A). Los resultados, luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno medido por triplicado. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 76.87mg/ml de proteína total. Al analizar los resultados no se observan grandes variaciones entre los diferentes grupos, probablemente porque al colocar todo el lisado en la placa, IκB compite desproporcionadamente con la abundancia de antígenos celulares por unirse a la placa. Esta unión es al azar, lo cual dificulta la interpretación de los resultados. En el momento de realizar este trabajo no se tenía disponibilidad de anticuerpos de dos especies para hacer ELISA de captura que concentra el antígeno. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos; cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$  con un  $n=6$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados.

**Tabla 5-13:** ELISA del modelo *in vivo*: absorbancia de la proteína IκB

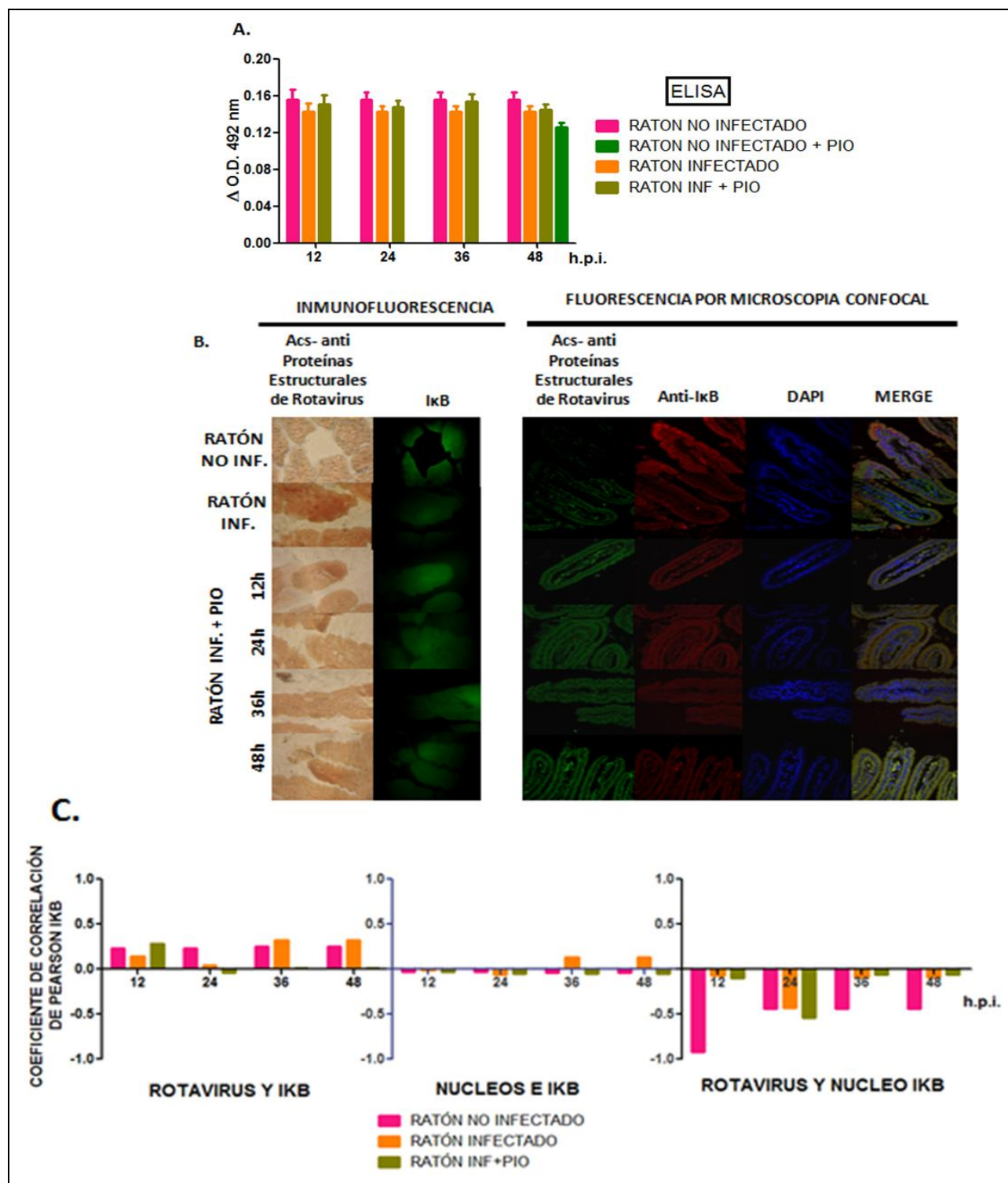
GRUPOS DE RATONES		ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA IκB	VARIANZA
RATONES NO INFECTADOS		0.156	0.008
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA		0.126***	0.004
RATONES INFECTADOS		0.143**	0.006
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	0.151 NS	0.007
	24 h.p.i.	0.148 NS	0.007
	36 h.p.i.	0.154 *	0.008
	48 h.p.i.	0.145 NS	0.006
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i. $P < 0.0001$ , 24 h.p.i. $P < 0.0001$ , 36 h.p.i. $P < 0.0001$ y 48 h.p.i. $P < 0.0001$ ) y de color rojo comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. $P < 0.0001$ , 24 h.p.i. $P < 0.0001$ , 36 h.p.i. $P < 0.0001$ y 48 h.p.i. $P < 0.0001$ ) con $n=6$ .			

En las fotografías representativas de la fluorescencia de microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos de duodeno se encontró disminución de antígenos virales, en los ratones a los que se les administró pioglitazona pero aumentó la expresión de IκB, comparados con aquellos que solamente fueron infectados a diferentes h.p.i. (Figura 5-12B). Estas mismas láminas fueron analizadas por el programa ImageJ (plugins, colocalization Finder) para calcular la colocalización entre las proteínas virales e IκB, según el coeficiente de correlación de Pearson. Se encontró un coeficiente de correlación de 0.1 para la colocalización entre IκB y los antígenos de rotavirus en las vellosidades de los ratones que habían sido infectados y el mismo valor para los infectados y tratados con pioglitazona. Este valor corresponde, para ambos casos, a lo hallado en los diferentes tiempos analizados (12, 24, 36 y 48 h.p.i.), indicando una correlación aleatoria. IκB es un inhibidor del factor transcripcional NFκB que se encuentra en el citoplasma, impidiendo que esta proteína sea fosforilada y se trasloque al núcleo. Por esto, como control se analizó la colocalización entre el núcleo y la proteína IκB que fue de -0.02 en los tres grupos de ratones y entre el núcleo y los antígenos de rotavirus (se expresan solo en citoplasma) que tuvieron un coeficiente de colocalización de Pearson de -0,3 en los tres grupos de ratones (no infectados,



infectados y los tratados con pioglitazona) en las diferentes h.p.i., indicando que hay una correlación aleatoria (Figura 5-12B). Resultados realizados por duplicado.

**Figura 5-12:** La expresión de I $\kappa$ B cambia en las vellosidades intestinales extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona (modelo *in vivo*). **A.** ELISA de la expresión de la proteína celular I $\kappa$ B. Modelo *in vivo*. **B.** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular I $\kappa$ B. (Ver tamaño real anexo K) **C.** Calculo de la colocalización entre las proteínas mediante el coeficiente de correlación de Pearson, utilizando el programa ImageJ.



### 5.7. La expresión de Cox-2 cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*.

La expresión de la proteína Cox-2 puede ser inducida por NFκB. Por esto, se quiso analizar si cambia la expresión de la proteína Cox-2 en las vellosidades de los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona, respecto a los infectados sin tratamiento. Se aislaron las vellosidades de estos ratones y se analizaron mediante las técnicas de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, microscopía confocal y citometría de flujo.

En el modelo *in vivo*, fotografías representativas de cada una de las horas evaluadas (12, 24, 36 y 48 h.p.i.) mostraron que los ratones a los que se les administró pioglitazona disminuye la presencia de antígenos virales, comparados con aquellos que solamente fueron infectados; al analizar las mismas láminas por inmunofluorescencia se observó que la intensidad de la fluorescencia disminuye en los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona en comparación con los ratones que solo fueron infectados con rotavirus. Como control de la fluorescencia basal se utilizaron los ratones no infectados y ratones no infectados pero que se les administro pioglitazona (Figura 5-13A).

Para determinar la expresión de la proteína celular Cox-2 en el modelo *in vivo* mediante inmunofluorescencia, en cada uno de los tratamientos se realizó un conteo de las células en las vellosidades procedentes de ratones no infectados, no infectados y tratados con pioglitazona, infectados e infectados y tratados con pioglitazona, por medio del programa ImageJ (plugins, cell counter). Se observó disminución del número de células positivas en los ratones infectados y tratados con pioglitazona respecto a los infectados sin tratamiento (Tabla 5-14), (Figura 5-13B). Resultados obtenidos de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada h.p.i. evaluada, por cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$  con un  $n=4$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados.

**Tabla 5-14:** Inmunofluorescencia del modelo *in vivo* de porcentaje de células positivas para Cox-2

GRUPOS DE RATONES		PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA Cox-2	DESVIACIÓN ESTANDAR
RATONES NO INFECTADOS		40.3%	2.84
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA		42.3% <b>NS</b>	2.91
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	58.5% <b>***</b>	3.42
	24 h.p.i.	75.7% <b>***</b>	3.89
	36 h.p.i.	84.7% <b>***</b>	4.11
	48 h.p.i.	84.4% <b>***</b>	4.11
RATONES INFECTADOS +	12 h.p.i.	53.3% <b>*</b>	3.26

PIOGLITAZONA	24 h.p.i.	56.0%***	3.35
	36 h.p.i.	58.0%***	3.41
	48 h.p.i.	60.9%***	3.49
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) y de color rojo comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) con n=4			

Al analizar en las mismas muestras el conteo de la fluorescencia total corregida (CTCF) para cada uno de los grupos de ratones por medio del programa Image J (Analyze, measure). Se observó una fluorescencia de 1'640.260 en los ratones no infectados y en los ratones no infectados y tratados con pioglitazona de 1'417.566. A las 12, 24, 36 y 48 h.p.i., se observó que los ratones infectados y tratados con pioglitazona tienen una fluorescencia de 2'732.840, 1'880.921, 2'758.707 y 3'744.016, mientras que los ratones infectados tuvieron una fluorescencia de 2'930.111, 3'288.869, 3'109.016 y 5'750.680 (Figura 5-13C). Este resultado fue tomado del promedio de lectura 15 células por fotografía de un total de 10 fotografías tomadas por grupo de ratón, por hora post-infección evaluada.

Para correlacionar la infección viral con la expresión de Cox-2, se evaluó simultáneamente el antígeno viral y Cox-2 mediante la técnica de citometría de flujo. Se encontró la misma tendencia a lo descrito en los anteriores experimentos, con otras metodologías. Las vellosidades procedentes de ratones no infectados fueron positivas para Cox-2 en 0.8% y el antígeno viral lo fue en 5.8%. En las células procedentes de ratones infectados la expresión de Cox-2 fue de 37.4% y la detección de antígenos virales fue de 23.6%. En las células procedentes de ratones infectados y tratados con pioglitazona durante 12, 24, 36 y 48 h.p.i., la expresión de Cox-2 fue de 22.5%, 20.3%, 31.1% y 8.2%; el porcentaje de los antígenos virales fue de 30.7%, 21.0%, 7.5% y 0.1% (Figura 5-13D). Como controles de la técnica se utilizaron células sin ningún anticuerpo; células con un anticuerpo primario no relacionado, más los anticuerpos secundarios y células con los anticuerpos secundarios, sin anticuerpo primario.

En el modelo *in vitro*, vellosidades aisladas y luego infectadas, tratadas o no con pioglitazona se emplearon para realizar inmunofluorescencia con el fin de evaluar la expresión de Cox-2. Para el conteo celular se empleó el programa ImageJ (plugins, cell counter). Se observó disminución del número de células positivas en los ratones infectados y tratados con pioglitazona respecto a los infectados sin tratamiento (Tabla5-15). Los resultados son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 15 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada h.p.i. evaluada y para cada tipo de proteína (Figura 5-13E). En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 con un n=4 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados.

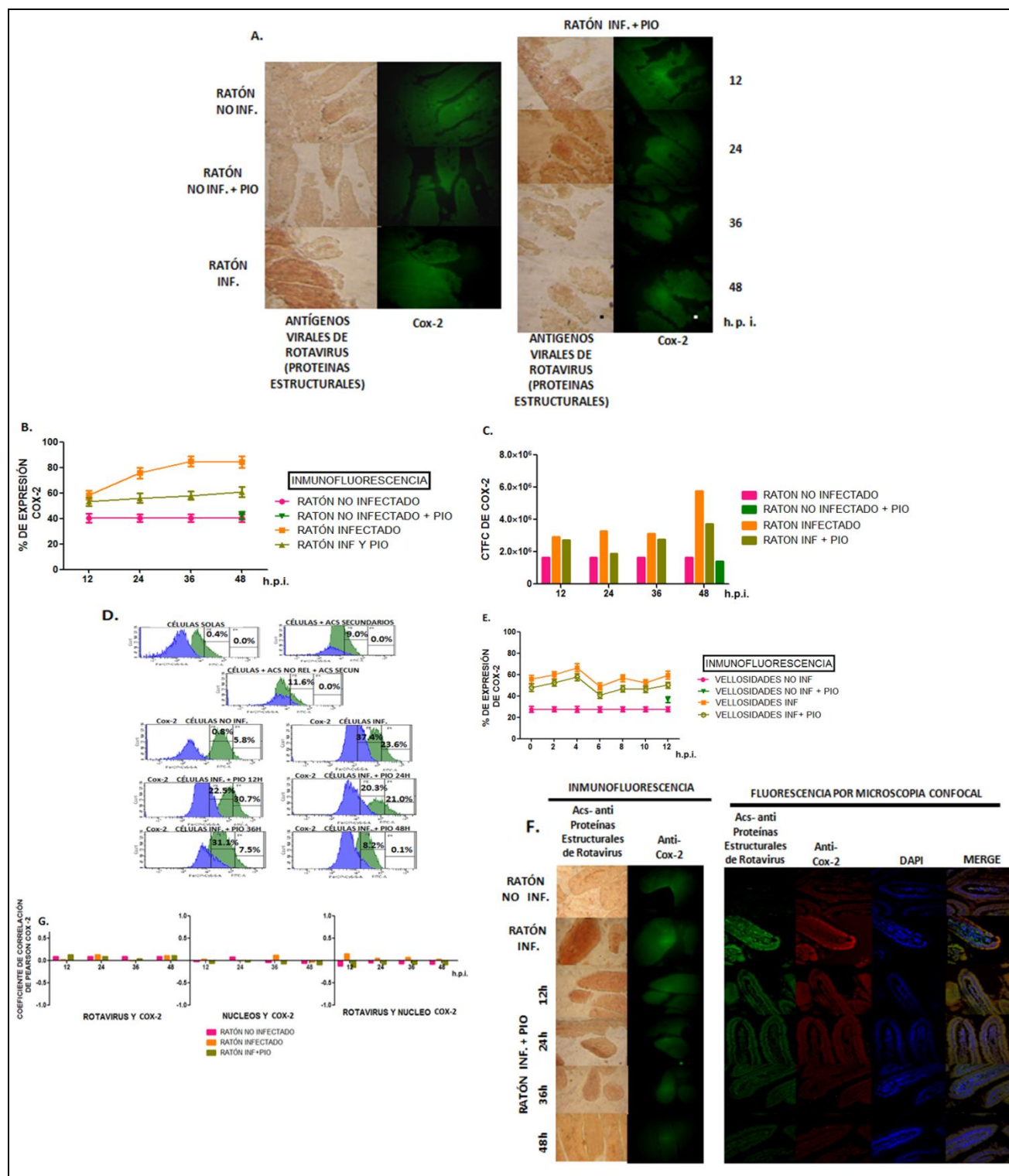
**Tabla 5-15:** Inmunofluorescencia modelo *in vitro* del porcentaje de células positivas para Cox-2

GRUPOS DE VELLOSIDADES	PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA Cox-2		DESVIACIÓN ESTANDAR
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	27.5%		2.35
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	36.5% **		2.70
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	55.6% ***	3.33
	2 h.p.i.	59.6% ***	3.45
	4 h.p.i.	66.5% ***	3.65
	6 h.p.i.	49.0% ***	3.13
	8 h.p.i.	56.7% ***	3.37
	10 h.p.i.	52.3% ***	3.24
	12 h.p.i.	59.5% ***	3.45
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	47.8% *	3.09
	2 h.p.i.	52.4% *	3.24
	4 h.p.i.	57.7% **	3.40
	6 h.p.i.	41.0% **	2.86
	8 h.p.i.	47.0% **	3.07
	10 h.p.i.	46.3% *	3.04
	12 h.p.i.	50.1% **	3.16
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. <b>Color azul</b> comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de <b>color rojo</b> comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=4.			

En el modelo *in vivo*, en cortes histológicos de duodeno de ratones experimentales, al analizar la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia los antígenos virales disminuyeron en los ratones a los que se les administró pioglitazona respecto a los infectados sin tratamiento. Igualmente disminuyó la expresión de Cox-2, evaluada como disminución en la intensidad de fluorescencia. Se muestran las fotografías representativas de cada uno de los grupos de ratones a diferentes h.p.i. (Figura 5-13F). Estas mismas placas fueron analizadas por el programa ImageJ (plugins, colocalization Finder) para calcular la colocalización entre las proteínas virales y Cox-2, según el coeficiente de correlación de Pearson. Se encontró un coeficiente de correlación de 0.1 para la colocalización entre Cox-2 y los antígenos de rotavirus en las vellosidades de los ratones que habían sido infectados y el mismo valor para los infectados y tratados con pioglitazona. Este valor corresponde, para ambos casos, a lo hallado en los diferentes tiempos analizados (12, 24, 36 y 48 h.p.i.), indicando una correlación aleatoria. Cox-2 es un factor transcripcional que se encuentra principalmente en el citoplasma. Por esto, como control se analizó la colocalización entre el núcleo y la proteína Cox-2 y entre el núcleo y los antígenos de rotavirus (se expresan solo en citoplasma) y el coeficiente de colocalización de Pearson fue de -0,1 en los tres grupos de ratones (no infectados, infectados y los tratados con pioglitazona) en las diferentes h.p.i., indicando que hay una correlación aleatoria (Figura 5-13G). Resultados realizados por duplicado.

**Figura 5-13:** La expresión de Cox-2 cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*. **A.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de Cox-2 en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver tamaño real anexo L) **B.** Conteo del porcentaje de expresión de la proteína Cox-2, evaluada por inmunofluorescencia modelo *in vivo*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ.

C. Calculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ. Modelo *in vivo*. D. Citometría de flujo, expresión de los antígenos virales de color verde y expresión de la proteína celular Cox-2 color azul. Modelo *in vivo*. E. Conteo del porcentaje de expresión de NFκB, evaluadas por inmunofluorescencia modelo *in vitro*. El conteo se realizo utilizando el programa ImageJ. F. Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular Cox-2. (Ver tamaño real anexo M) G. Calculo de la colocalización entre las proteínas mediante el coeficiente de correlación de Pearson, utilizando el programa ImageJ.





### 5.8. La producción de especies reactivas de oxígeno varía en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*.

La producción de especies reactivas de oxígeno (“ROS” o EROs) puede inducir la expresión de la proteína Cox-2; por esto, se quiso analizar si varía la producción de especies reactivas de oxígeno en las vellosidades de los ratones que fueron infectados respecto a los infectados y tratados con pioglitazona. Se aislaron las vellosidades de estos ratones y se analizaron mediante el kit Cellomics® Oxidative Stress I el cual tiene como principio que las especies reactivas de oxígeno convierten el dihidroetidio (DHE) no fluorescente a etidio fluorescente, y posteriormente se intercala en el ADN. Simultáneamente se adicionó el colorante Hoechst 33342 el cual se utiliza para identificar los núcleos de las células individuales y la fluorescencia del DHE evalúa el estrés oxidativo.

En el modelo *in vivo*, fotografías representativas de cada una de las horas evaluadas (12, 24, 36 y 48 h.p.i.) mostraron que los ratones a los que se les administró pioglitazona disminuye la presencia de especies reactivas de oxígeno, comparados con aquellos que solamente fueron infectados, observándose como la disminución de la intensidad de fluorescencia. Como control, se utilizaron los ratones no infectados (Figura 5-14A). Igualmente, se realizó un conteo de las células positivas en las vellosidades procedentes de ratones no infectados, no infectados y tratados con pioglitazona, infectados e infectados y tratados con pioglitazona, por medio del programa ImageJ (plugins, cell counter). Se encontró una positividad de ROS en las células de las vellosidades procedentes de ratones no infectados de 38.6%. A las 12, 24, 36 y 48 h.p.i. se observó que los ratones infectados y tratados con pioglitazona tienen una positividad de 47.0%, 42.8%, 50.0% y 39.8% observándose que disminuyen en comparación con los ratones infectados que tienen una positividad de 70.7%, 77.0%, 80.5% y 69.0% (Figura 5-14B). Resultados obtenidos de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada grupo de ratones, por cada hora post-infección evaluada. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P < 0.0001$  con un  $n=6$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados. (Tabla 5-16).

**Tabla 5-16:** Porcentajes de células positivas para ROS modelo *in vivo*

GRUPOS DE RATONES		PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA ROS o EROs	DESVIACIÓN ESTANDAR
RATONES NO INFECTADOS		38.6%,	1.87
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	70.7%***	2.54
	24 h.p.i.	77.0%***	2.65
	36 h.p.i.	80.5%***	2.71
	48 h.p.i.	69.0%***	2.50

RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	47.0% ***	2.07
	24 h.p.i.	42.8% ***	1.97
	36 h.p.i.	50.0%***	2.13
	48 h.p.i.	39.8%***	1.90
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) y de color rojo comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) con n=6.			

Al analizar en las mismas muestras el conteo de la fluorescencia total corregida (CTCF) para cada uno de los grupos de ratones por medio del programa Image J (Analyze, measure), se realizó aplicando la siguiente fórmula: CTCF= Densidad integrada- (Área seleccionada de la célula X medida de la fluorescencia del área del fondo sin fluorescencia); donde se observó una tendencia similar a los resultados presentados anteriormente en los ratones no infectados la fluorescencia fue de 4'141.010. A las 12, 24, 36 y 48 h.p.i. se observa que los ratones infectados y tratados con pioglitazona tienen una fluorescencia de 4'306.239, 4'407.745, 6'230.920 y 5'217.473, los ratones infectados tuvieron una fluorescencia de 5'339.615, 4'815.034, 7'388.813 y 7'915.786. (Figura 5-14C). Este resultado fue tomado del promedio de lectura 15 células por fotografía de un total de 10 fotografías, por grupo de ratón, por hora post-infección evaluada.

En el modelo *in vitro*, vellosidades aisladas y luego infectadas, tratadas o no con pioglitazona se emplearon para realizar fluorescencia con el fin de evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno. Para el conteo celular se empleó el programa Image J (plugins, cell counter). El resultado indicó, en vellosidades no infectadas, positividad para ROS fue de 36.5%. En vellosidades infectadas la positividad de ROS fue de 70.0%, 74.8%, 93.3%, 90.0%, 98.9%, 87.1% y 99.6% para 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h.p.i., respectivamente. En vellosidades infectadas y tratadas con pioglitazona, la positividad fue de 47.0%, 47.9%, 38.9%, 39.9%, 43.0%, 44.6% y 53.1%, para los mismos tiempos de tratamiento (Tabla 5-17). Este resultado fue tomado del promedio 15 fotografías, por grupo de vellosidades, por hora post-infección evaluada. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia (72) entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 con un n=4 (Figura 5-14D).

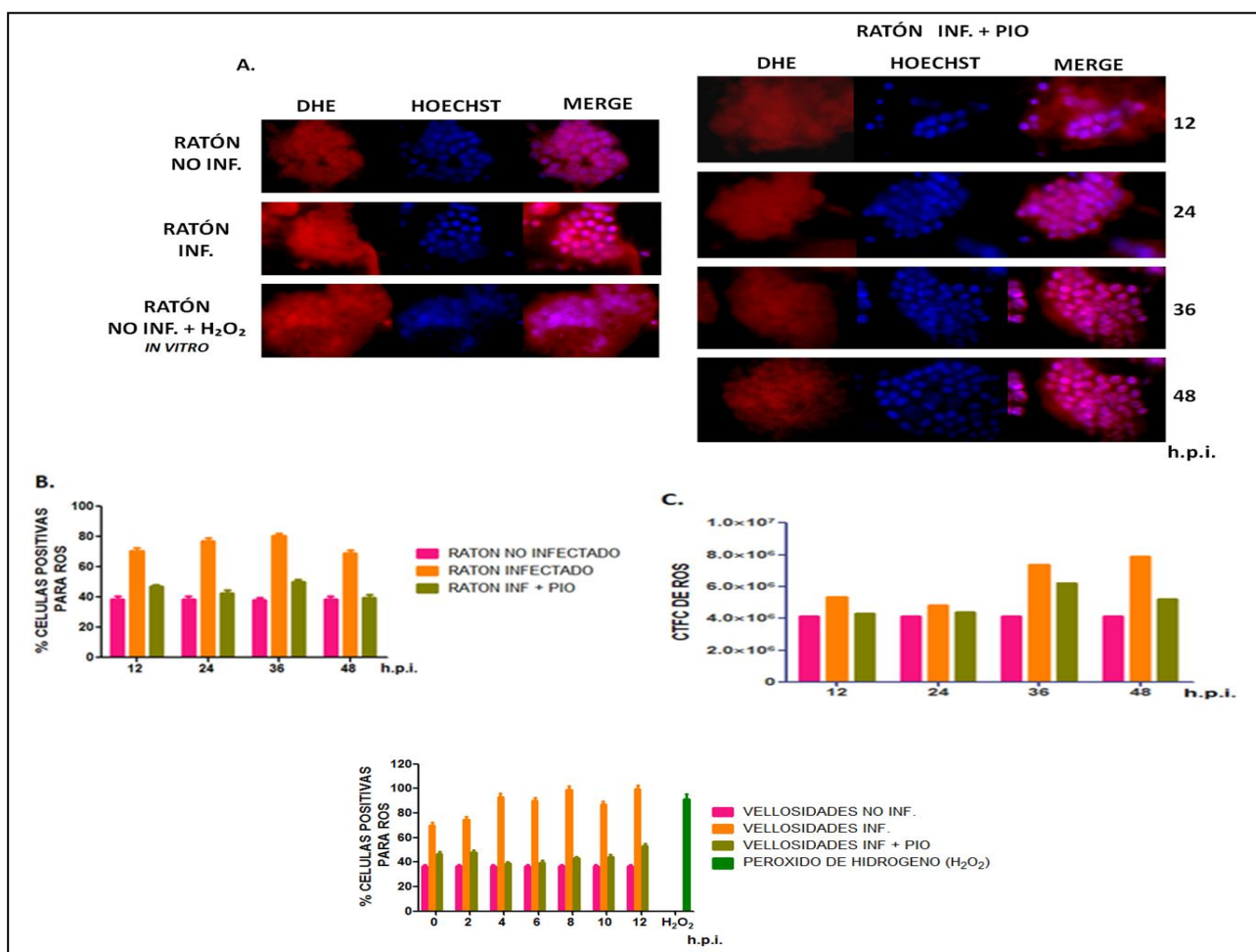
**Tabla 5-17:** Porcentajes de células positivas para ROS modelo *in vitro*

GRUPOS DE VELLOSIDADES	% CÉLULAS POSITIVAS PARA ROS o EROs		DESVIACIÓN ESTANDAR
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	36.5%		1.35
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	70.0%***	2.27
	2 h.p.i.	74.8%***	2.38
	4 h.p.i.	93.3%***	2.74
	6 h.p.i.	90.0%***	2.68
	8 h.p.i.	98.9%***	2.84
	10 h.p.i.	87.1%***	2.62

	12 h.p.i.	99.6%***	2.85
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	47.0%***	1.70
	2 h.p.i.	27.9%***	1.72
	4 h.p.i.	38.9%***	1.43
	6 h.p.i.	39.9%***	1.47
	8 h.p.i.	43.0%***	1.57
	10 h.p.i.	44.6%***	1.62
	12 h.p.i.	53.1%***	1.87
CONTROL: PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		91.4%***	3.16

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=4

**Figura 5-14:** La producción de especies reactivas de oxígeno puede variar en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*. **A.** Fotografías representativas de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS u EROs) en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona; modelo *in vivo*, utilizando el kit Cellomics® Oxidative Stress I (Ver tamaño real anexo N) **B.** Conteo del porcentaje de células positivas para ROS, evaluadas por fluorescencia, modelo *in vivo*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ. **C.** Cálculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ. Modelo *in vivo*. **D.** Conteo del porcentaje de células positivas para ROS, evaluadas por fluorescencia, modelo *in vitro*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ.





### 5.9. La expresión de PDI cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*.

Cuando hay aumento las EROS o ROS existe una alteración del mecanismo redox de la célula por lo tanto puede haber sobreexpresión de proteínas implicadas en dicho mecanismo, como PDI. Por esto, se quiso analizar si cambia la expresión de la proteína PDI en las vellosidades de los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona, respecto a los infectados sin tratamiento. Se aislaron las vellosidades de estos ratones y se analizaron mediante las técnicas de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, ELISA, microscopía confocal y citometría de flujo.

En el modelo *in vivo*, fotografías representativas de cada una de las horas evaluadas (12, 24, 36 y 48 h.p.i.) mostraron que los ratones a los que se les administró pioglitazona disminuye la presencia de antígenos virales, comparados con aquellos que solamente fueron infectados; al realizar el análisis en las mismas láminas por medio de inmunofluorescencia se observa que la intensidad de la fluorescencia disminuye en los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona en comparación con los ratones que solo fueron infectados con rotavirus. Como control de la fluorescencia basal se utilizaron los ratones no infectados y ratones no infectados que se les administró pioglitazona (Figura 5-15A).

Para determinar la expresión de la proteína celular PDI en el modelo *in vivo*, mediante inmunofluorescencia en cada uno de los tratamientos se realizó un conteo de las células en las vellosidades procedentes de ratones no infectados, no infectados y tratados con pioglitazona, infectados y tratados con pioglitazona y los solamente infectados, por medio del programa ImageJ (plugins, cell counter). Se encontró un aumento en la expresión de PDI en las vellosidades procedentes de ratones infectados, respecto a los no infectados y una ligera disminución de la expresión de PDI en las vellosidades procedentes de ratones infectados y tratados con pioglitazona en comparación con los ratones infectados (Tabla 5-18) (Figura 5-15B). Resultados obtenidos de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada hora post-infección evaluada, por cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P = 0.0005$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 24 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 36 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 48 h.p.i.  $P = 0.0005$  con un  $n=4$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados.

**Tabla 5-18:** Inmunofluorescencia del modelo *in vivo*: porcentaje de células positivas para PDI

GRUPOS DE RATONES	PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA PDI	DESVIACIÓN ESTANDAR
RATONES NO INFECTADOS	49.6%	3.15
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA	44.2%*	1.72

RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	77.0%***	3.93
	24 h.p.i.	58.9%NS	3.43
	36 h.p.i.	64.0%***	3.58
	48 h.p.i.	54.7%*	3.31
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	72.2%NS	3.80
	24 h.p.i.	51.5%**	3.21
	36 h.p.i.	58.0%*	3.41
	48 h.p.i.	50.0%NS	3.16

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=0.0005) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=0.0005) con n=4

La expresión de PDI también se evaluó mediante la técnica de ELISA en los mismos tiempos (12, 24, 36 y 48 h.p.i.). El resultado fue similar a lo hallado por inmunofluorescencia (Tabla 5-19) (Figura 5-15B). Los resultados resultan luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno medido por triplicado. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 76,87mg/ml de proteína total. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=0.0009, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=0.0009, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=0.0005 y 48 h.p.i. P=0.0028; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=0.0009, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=0.0005 y 48 h.p.i. P=0.0028 con un n=6 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados.

**Tabla 5-19:** ELISA en modelo *in vivo*, absorbancia de la proteína PDI

GRUPOS DE RATONES		ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA PDI	VARIANZA
RATONES NO INFECTADOS		0.561	0.080
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA		0.647 NS	0.092
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	0.905 ***	0.129
	24 h.p.i.	0.779 **	0.111
	36 h.p.i.	0.842 ***	0.120
	48 h.p.i.	0.802 **	0.115
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	0.612 **	0.087
	24 h.p.i.	0.390 ***	0.056
	36 h.p.i.	0.628 **	0.090
	48 h.p.i.	0.655 NS	0.094

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=0.0009, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=0.0009, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=0.0005 y 48 h.p.i. P=0.0028) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=0.0009, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=0.0005 y 48 h.p.i. P=0.0028) con n=6.

Se realizó en las mismas muestras de la inmunofluorescencia, el conteo de la fluorescencia total corregida (CTCF) para cada uno de los grupos de ratones por medio del programa Image J (Analyze, measure). En los ratones no infectados la fluorescencia fue de 1'386.412, en los ratones no infectados y tratados con pioglitazona fue de 1'243.743, a las 12, 24, 36 y 48 h.p.i. En los ratones infectados y tratados con pioglitazona fue de 1'997.213, 1'973.403, 1'636.828 y 2'106.697. Los ratones infectados la fluorescencia fue 2'966.168, 2'148.613, 2'325.821 y 2'751.873. (Figura 5-15C). Este resultado fue tomado del promedio de lectura 15 células por fotografía de un total de 10 fotografías tomadas por grupo de ratón, por hora post-infección evaluada.

Para correlacionar la infección viral con la expresión de PDI, se evaluó simultáneamente el antígeno viral y PDI mediante la técnica de citometría de flujo. Las vellosidades procedentes de ratones no infectados fueron positivas para PDI en 2.6%, y el antígeno viral lo fue en 5.8%. En las células procedentes de ratones infectados la expresión de PDI fue de 13.5% y la detección de antígenos virales fue de 23.6%. En las células procedentes de ratones infectados y tratados con pioglitazona durante 12, 24, 36 y 48 h.p.i., la expresión de PDI fue de 8.3%, 7.5%, 19.7% y 3.3%; el porcentaje de los antígenos virales fue de 30.7%, 21.0%, 7.5% y 0.1% (Figura 5-15D). Como controles de la técnica se utilizaron células sin ningún anticuerpo; células con un anticuerpo primario no relacionado, más los anticuerpos secundarios; y células con los anticuerpos secundarios, sin anticuerpo primario.

En el modelo *in vitro*, vellosidades aisladas y luego infectadas, tratadas o no con pioglitazona se emplearon para realizar inmunofluorescencia y ELISA con el fin de evaluar la expresión de PDI. Para la inmunofluorescencia el conteo celular se empleó el programa ImageJ (plugins, cell counter) y se encontró un aumento en la expresión de PDI en las vellosidades infectadas, respecto a los no infectadas y una ligera disminución de la expresión de PDI en las vellosidades infectadas y tratadas con pioglitazona en comparación con las infectadas (Tabla 5-20). Resultados obtenidos de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada hora post-infección evaluada, por cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P < 0.0001$ , Ratones Inf: 0 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 2 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 4 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 6 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 8 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 10 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 12 h.p.i.  $P < 0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 2 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 4 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 6 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 8 h.p.i.  $P < 0.0001$ , 10 h.p.i.  $P < 0.0001$  y 12 h.p.i.  $P < 0.0001$  con un  $n=4$  (Figura 5-15E).

**Tabla 5-20:** Inmunofluorescencia modelo *in vitro*: porcentajes de células positivas para PDI

GRUPOS DE VELLOSIDADES	% DE CÉLULAS POSITIVAS PARA PDI		DESVIACIÓN ESTANDAR
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	36.5%		2.70
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	37.3% <b>NS</b>		2.73
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	49.1%***	3.13
	2 h.p.i.	59.9%***	3.46
	4 h.p.i.	74.9%***	3.87
	6 h.p.i.	69.9%***	3.74
	8 h.p.i.	68.5%***	3.77
	10 h.p.i.	75.2%***	3.88

	12 h.p.i.	55.3%***	3.32
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	46.0%NS	3.03
	2 h.p.i.	51.1%**	3.20
	4 h.p.i.	58.8%***	3.43
	6 h.p.i.	54.8%***	3.31
	8 h.p.i.	55.5%***	3.33
	10 h.p.i.	67.5%*	3.67
	12 h.p.i.	41.9%***	2.90
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de color rojo comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=<0.0001, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=4.			

PDI también se analizó mediante la técnica de ELISA, en el experimento *in vitro* en los mismos tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10 y h.p.i.). Se observó aumento en la expresión de PDI en las vellosidades infectadas, respecto a los no infectadas y una ligera disminución de la expresión de PDI en las vellosidades infectadas y tratadas con pioglitazona en comparación con las infectadas (Tabla 5-21) (Figura 5-15E). Los resultados, luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno medido por triplicado. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 18,76mg/ml de proteína total. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=0.9650, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.9650, 2 h.p.i. P=0.1614, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=0.5140; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.9650, 2 h.p.i. P=0.1614, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=0.5140 con un n=6 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados.

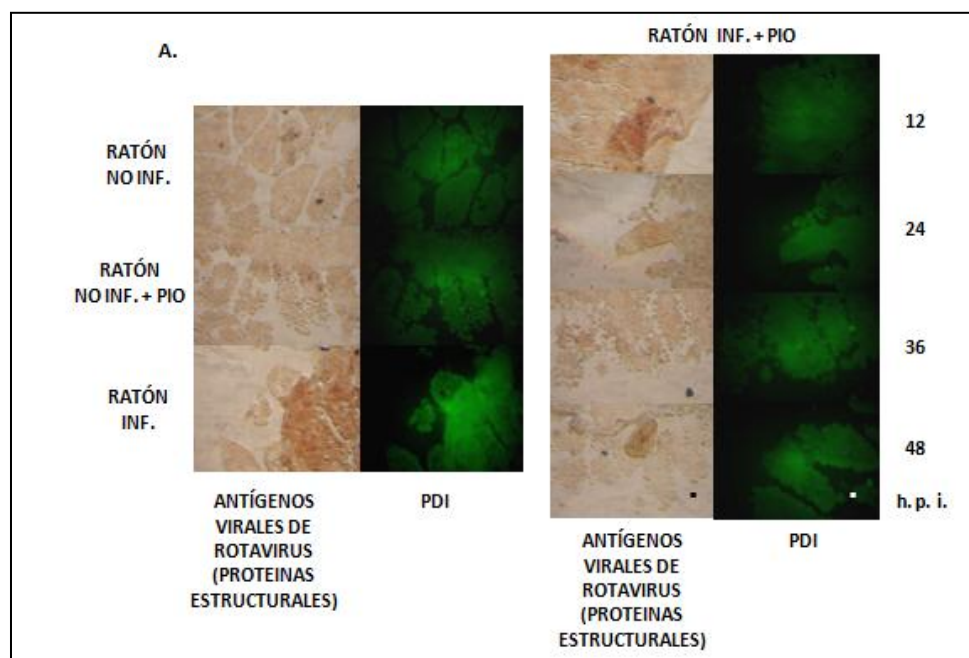
**Tabla 5-21:** ELISA del modelo *in vitro*: absorbancia de la proteína PDI.

GRUPOS DE VELLOSIDADES	ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA PDI		VARIANZA
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0.108		0.015
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0.109 NS		0.016
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	0.112 NS	0.016
	2 h.p.i.	0.122 NS	0.017
	4 h.p.i.	0.238***	0.034
	6 h.p.i.	0.194 ***	0.035
	8 h.p.i.	0.228 ***	0.033
	10 h.p.i.	0.213***	0.030
	12 h.p.i.	0.097 NS	0.015
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	0.108 NS	0.015
	2 h.p.i.	0.101 NS	0.014
	4 h.p.i.	0.214NS	0.031
	6 h.p.i.	0.127 ***	0.026
	8 h.p.i.	0.118 ***	0.017
	10 h.p.i.	0.155***	0.022
	12 h.p.i.	0.104 NS	0.015
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de			

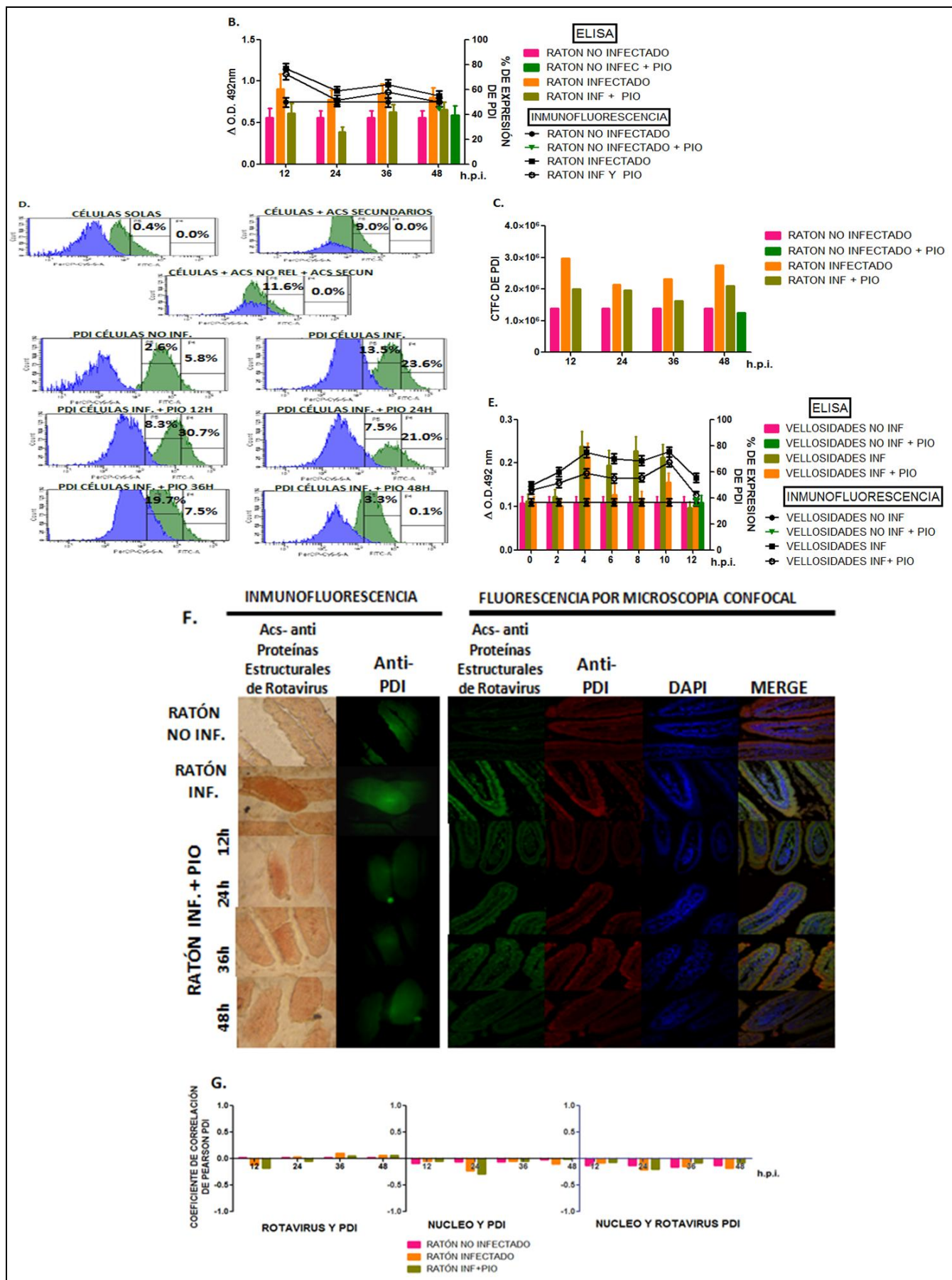
una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=0.9650, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.9650, 2 h.p.i. P=0.1614, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=0.5140) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.9650, 2 h.p.i. P=0.1614, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=0.5140) con n=6.

En el modelo *in vivo*, en cortes histológicos de duodeno de ratones experimentales, se encontró que al analizar la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia los antígenos virales disminuyeron en los ratones a los que se les administró pioglitazona respecto a los infectados sin tratamiento. Igualmente disminuyó la expresión de PDI, evaluada como disminución en la intensidad de fluorescencia. Se muestran las fotografías representativas de cada uno de los grupos de ratones a diferentes horas post-infección (Figura 5-15F). Estas mismas placas fueron analizadas por el programa ImageJ (plugins, colocalization Finder) para calcular la colocalización entre las proteínas virales y PDI, según el coeficiente de correlación de Pearson. Se encontró un coeficiente de correlación de 0.02 para la colocalización entre PDI y los antígenos de rotavirus en las vellosidades de los ratones que habían sido infectados y el mismo valor para los infectados y tratados con pioglitazona. Este valor corresponde, para ambos casos, a lo hallado en los diferentes tiempos analizados (12, 24, 36 y 48 h.p.i.), indicando una correlación aleatoria. PDI se encuentra en el citoplasma; por esto, como control se analizó la colocalización entre el núcleo y la proteína PDI y entre el núcleo y los antígenos de rotavirus (se expresan solo en citoplasma) y el coeficiente de colocalización de Pearson fue de -0,1 en los tres grupos de ratones (no infectados, infectados y los tratados con pioglitazona) en las diferentes h.p.i., indicando que hay una correlación aleatoria (Figura 5-15G). Resultados realizados por duplicado.

**Figura 5-15:** La expresión de PDI cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*. **A.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de PDI en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver tamaño real anexo O) **B.** ELISA y conteo del porcentaje de expresión de la proteína PDI, evaluada por inmunofluorescencia modelo *in vivo*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ. **C.** Cálculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ. Modelo *in vivo*. **D.** Citometría de flujo, expresión de los antígenos virales de color verde y expresión de la proteína celular PDI color azul. Modelo *in vivo*. **E.** ELISA y conteo del porcentaje de expresión de PDI, evaluadas por inmunofluorescencia modelo *in vitro*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ. **F.** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular PDI. (Ver tamaño real anexo P) **G.** Cálculo de la colocalización entre las proteínas mediante el coeficiente de correlación de Pearson, utilizando el programa ImageJ.







### 5.10. La expresión de Hsc70 cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*.

Cuando hay aumento las EROS o ROS puede ocasionar desnaturalización de proteínas y como mecanismo compensatorio aumentar las proteínas de choque térmico, como Hsc70. Adicionalmente, se ha reportado que Hsc70 está implicada en el proceso infeccioso (21, 34). Por esto, se quiso analizar si cambia la expresión de la proteína Hsc70 en las vellosidades de los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona, respecto a los infectados sin tratamiento. Se aislaron las vellosidades de estos ratones y se analizaron mediante las técnicas de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, ELISA, microscopía confocal y citometría de flujo.

En el modelo *in vivo*, fotografías representativas de cada una de las horas evaluadas (12, 24, 36 y 48 h.p.i.) mostraron que los ratones a los que se les administró pioglitazona disminuye la presencia de antígenos virales, comparados con aquellos que solamente fueron infectados; al realizar el análisis en las mismas láminas por medio inmunofluorescencia se observó que la intensidad de la fluorescencia disminuye en los ratones que fueron infectados y tratados con pioglitazona en comparación con los ratones que solo fueron infectados con rotavirus, como control de la fluorescencia basal se utilizaron los ratones no infectados y ratones no infectados pero que se les administró pioglitazona (Figura 5-16A).

Para determinar la expresión de la proteína celular Hsc70 en el modelo *in vivo*, mediante inmunofluorescencia en cada uno de los tratamientos se realizó un conteo de las células en las vellosidades procedentes de ratones no infectados, no infectados y tratados con pioglitazona, infectados e infectados y tratados con pioglitazona, por medio del programa ImageJ (plugins, cell counter). Se encontró aumento de la expresión de la proteína en las células de las vellosidades procedentes de ratones infectados respecto a los infectados y tratados con pioglitazona (Tabla 5-22) (Figura 5-16B). Los resultados son obtenidos de dos experimentos cada uno medido por duplicado y del conteo de 10 fotografías tomadas para cada grupo de ratones por cada hora post-infección evaluada, por cada tipo de proteína. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio  $P=<0.0001$ , Ratones Inf: 12 h.p.i.  $P=<0.0001$ , 24 h.p.i.  $P=<0.0001$ , 36 h.p.i.  $P=<0.0001$  y 48 h.p.i.  $P=<0.0001$ ; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i.  $P=<0.0001$ , 24 h.p.i.  $P=<0.0001$ , 36 h.p.i.  $P=<0.0001$  y 48 h.p.i.  $P=<0.0001$  con un  $n=4$ .

**Tabla 5-22:** Porcentajes de células positivas para Hsc70 inmunofluorescencia modelo *in vivo*

GRUPOS DE RATONES		PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA Hsc70	DESVIACIÓN ESTANDAR
RATONES NO INFECTADOS		40.3%	3.17
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA		36.3% <b>NS</b>	2.70
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	83.7% <b>***</b>	4.57
	24 h.p.i.	62.4% <b>***</b>	3.95
	36 h.p.i.	59.5% <b>***</b>	3.86

RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	48 h.p.i.	57.8%***	3.80
	12 h.p.i.	46.3%***	3.40
	24 h.p.i.	43.6%***	3.30
	36 h.p.i.	44.3%***	3.33
	48 h.p.i.	48.7%***	3.49
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. <b>Color azul</b> comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) y de <b>color rojo</b> comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) con n=4			

Este experimento también se evaluó mediante la técnica de ELISA en los mismos tiempos (12, 24, 36 y 48 h.p.i.). Se encontró mayor absorbancia en las células de las vellosidades procedentes de ratones infectados respecto a los infectados y tratados con pioglitazona sugiriendo que hay una disminución de la expresión de la proteína en los ratones infectados y tratados con pioglitazona en comparación a los ratones infectados sin tratamiento (Tabla 5-23) (Figura 5-16B). Los resultados, luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno por triplicado. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 76,87mg/ml de proteína total. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon los ratones no infectados y los ratones infectados mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=0.0003; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=0.0003 con un n=6.

**Tabla 5-23:** ELISA del modelo *in vivo*: absorbancia de la proteína Hsc70

GRUPOS DE RATONES	ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA Hsc70	VARIANZA
RATONES NO INFECTADOS	0.435	0.062
RATONES NO INFECTADOS + PIOGLITAZONA	0.619 NS	0.088
RATONES INFECTADOS	12 h.p.i.	1.245 ***
	24 h.p.i.	0.908 ***
	36 h.p.i.	0.783 ***
	48 h.p.i.	0.700 ***
RATONES INFECTADOS + PIOGLITAZONA	12 h.p.i.	0.475 ***
	24 h.p.i.	0.500***
	36 h.p.i.	0.412 ***
	48 h.p.i.	0.634 NS
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. <b>Color azul</b> comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=<0.0001, Ratones Inf: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) y de <b>color rojo</b> comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 12 h.p.i. P=<0.0001, 24 h.p.i. P=<0.0001, 36 h.p.i. P=<0.0001 y 48 h.p.i. P=<0.0001) con n=6.		

Al analizar en las mismas muestras de la inmunofluorescencia, el conteo de la fluorescencia total corregida (CTCF) para cada uno de los grupos de ratones por medio del programa Image J (Analyze, measure), se observó una fluorescencia de 1'278.629, en los ratones no infectados y en los tratados con pioglitazona fue de 1'183.766. A las 12, 24, 36 y 48 h.p.i. se observó una



fluorescencia, en los ratones infectados y tratados con pioglitazona, de 1'565.522, 1'289.792, 1'270.318 y 1'399.092, los ratones infectados tuvieron una fluorescencia de 2'309.201, 1'839.948, 1'571.390 y 1'483.685. (Figura 5-16C). Este resultado fue tomado del promedio de lectura 15 células por fotografía de un total de 10 fotografías tomadas por grupo de ratón, por hora post-infección evaluada.

Para correlacionar la infección viral con la expresión de Hsc70, se evaluó simultáneamente el antígeno viral y Hsc70 mediante la técnica de citometría de flujo. Las vellosidades procedentes de ratones no infectados fueron positivas para Hsc70 en 0.1%, y el antígeno viral lo fue en 5.8%. En las células procedentes de ratones infectados la expresión de Hsc70 fue de 7.7% y la detección de antígenos virales fue de 23.6%. En las células procedentes de ratones infectados y tratados con pioglitazona durante 12, 24, 36 y 48 h.p.i., la expresión de Hsc70 fue de 7.5%, 6.7%, 17.8% y 2.6%; el porcentaje de los antígenos virales fue de 30.7%, 21.0%, 7.5% y 0.1% (Figura 5-16D). Como controles de la técnica se utilizaron células sin ningún anticuerpo; células con un anticuerpo primario no relacionado, más los anticuerpos secundarios; y células con los anticuerpos secundarios, sin anticuerpo primario.

En el modelo *in vitro*, vellosidades aisladas y luego infectadas, tratadas o no con pioglitazona se emplearon para realizar inmunofluorescencia y ELISA con el fin de evaluar la expresión de Hsc70. Para el conteo celular se empleó el programa ImageJ (plugins, cell counter). Se encontró aumento de la expresión de la proteína en las células de las vellosidades procedentes de ratones infectados respecto a los infectados y tratados con pioglitazona. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=0.0007, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.0007, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.0007, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.000, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001 con un n=4 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados. (Tabla 5-24) (Figura 5-16E).

**Tabla 5-24:** Inmunofluorescencia del modelo *in vitro*: porcentajes de células positivas para Hsc70

GRUPOS DE VELLOSIDADES	PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA Hsc70		DESVIACIÓN ESTANDAR
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	39.8%		2.85
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	36.4% NS		2.70
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	47.8% **	3.12
	2 h.p.i.	65.0% ***	3.31
	4 h.p.i.	65.3% ***	3.32
	6 h.p.i.	60.8% **	3.66
	8 h.p.i.	54.2% *	3.35
	10 h.p.i.	56.5% *	3.54
	12 h.p.i.	58.1% **	3.41
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	44.6% NS	3.02
	2 h.p.i.	58.6% *	3.11
	4 h.p.i.	58.7% *	3.12
	6 h.p.i.	49.8% **	3.34
	8 h.p.i.	47.1% *	3.13
	10 h.p.i.	48.9% *	3.31
	12 h.p.i.	49.0% **	3.13

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=0.0007, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.0007, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.0007, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=<0.0001, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=<0.0001 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=4.

La expresión de Hsc70 también se analizó, mediante la técnica de ELISA, en los mismos tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10 y h.p.i.). Se encontró, en promedio, mayor absorbancia en las células de las vellosidades procedentes de ratones infectados respecto a los infectados y tratados con pioglitazona sugiriendo que hay una disminución de la expresión de la proteína en los ratones infectados y tratados con pioglitazona en comparación a los ratones infectados sin tratamiento (Tabla 5-25) (Figura 5-16E). Los resultados, luego de restar los valores de los controles negativos (incubación de todos los Acs en ausencia de lisados), son el promedio de dos experimentos cada uno medido por triplicado. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 18.76mg/ml de proteína total. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon las vellosidades no infectadas y las infectadas mostraron los siguientes valores de P: Ratones no Inf+Pio P=0.6854, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.6854, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=0.006, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=0.6131 y 12 h.p.i. P=<0.0001; la comparación entre los ratones infectados y los infectados y tratados con pioglitazona mostraron los siguientes valores de P: Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.6854, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=0.006, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=0.6131 y 12 h.p.i. P=<0.0001 un n=6 para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados.

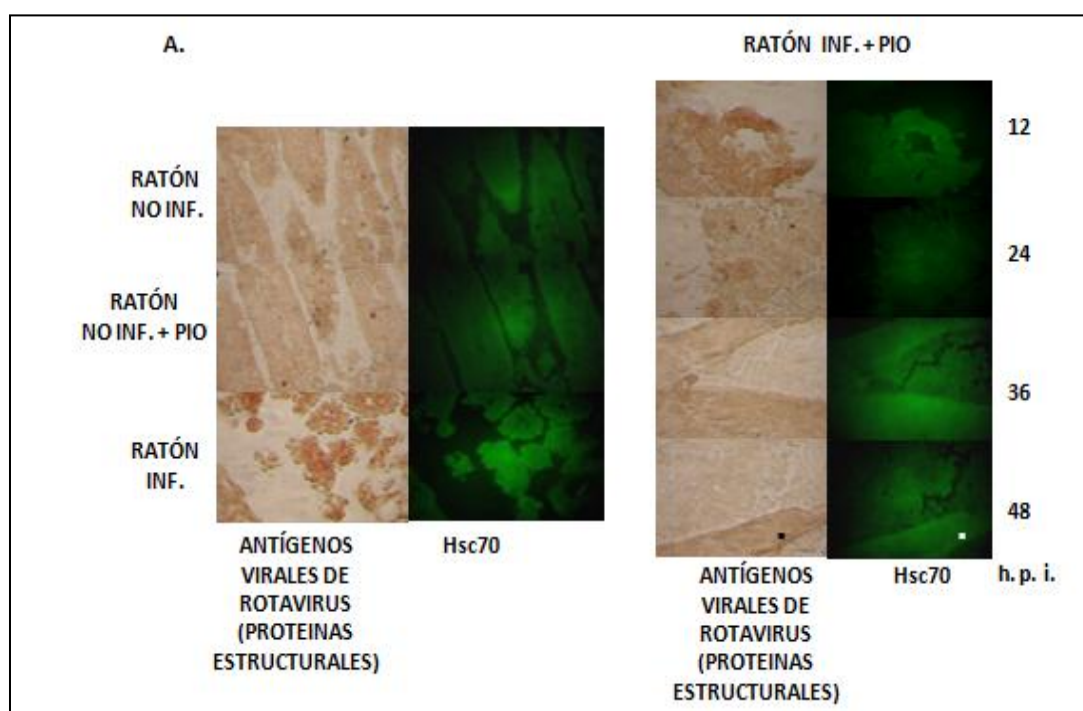
**Tabla 5-25:** Absorbancia de la proteína Hsc70 modelo *in vitro*, ensayo ELISA

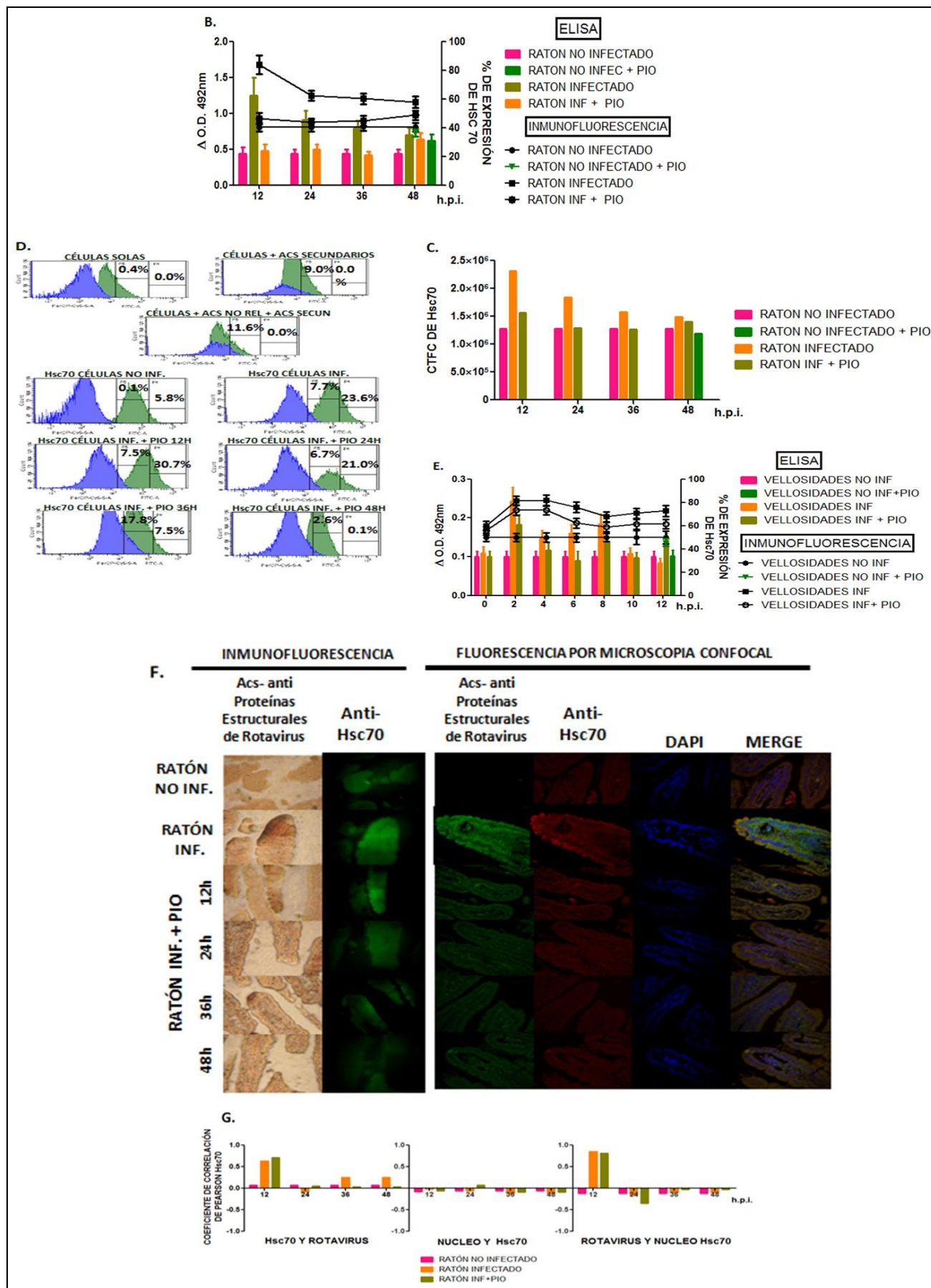
GRUPOS DE VELLOSIDADES	ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA Hsc70		VARIANZA
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0.128		0.018
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0.102 NS		0.015
VELLOSIDADES INFECTADAS	0 h.p.i.	0.137 NS	0.020
	2 h.p.i.	0.271 ***	0.039
	4 h.p.i.	0.174 ***	0.025
	6 h.p.i.	0.188 ***	0.027
	8 h.p.i.	0.212 ***	0.030
	10 h.p.i.	0.136 NS	0.019
	12 h.p.i.	0.111 NS	0.016
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA	0 h.p.i.	0.128 NS	0.018
	2 h.p.i.	0.210 ***	0.030
	4 h.p.i.	0.145 *	0.021
	6 h.p.i.	0.118 **	0.017
	8 h.p.i.	0.166 *	0.024
	10 h.p.i.	0.125 NS	0.018
	12 h.p.i.	0.168 ***	0.024

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** comparación ratones no infectados e infectados en las diferentes h.p.i. (Ratones no Inf+Pio P=0.6854, Ratones Inf: 0 h.p.i. P=0.6854, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=0.0006, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=0.6131 y 12 h.p.i. P=<0.0001) y de **color rojo** comparación ratones infectados e infectados + pioglitazona en las diferentes h.p.i. (Ratones Inf. + Pio: 0 h.p.i. P=0.6854, 2 h.p.i. P=<0.0001, 4 h.p.i. P=0.0006, 6 h.p.i. P=<0.0001, 8 h.p.i. P=<0.0001, 10 h.p.i. P=0.6131 y 12 h.p.i. P=<0.0001) con n=6.

En el modelo *in vivo*, en cortes histológicos de duodeno de ratones experimentales, al analizar la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia se observó que los antígenos virales disminuyeron en los ratones a los que se les administro pioglitazona respecto a los infectados sin tratamiento. Igualmente disminuyó la expresión de Hsc70, evaluada como disminución en la intensidad de fluorescencia. Se muestran las fotografías representativas de cada uno de los grupos de ratones a diferentes horas post-infección (Figura 5-16F). Estas mismas láminas fueron analizadas por el programa ImageJ (plugins, colocalization Finder) para calcular la colocalización entre las proteínas virales y Hsc70, según el coeficiente de correlación de Pearson. Se encontró un coeficiente de correlación de 0.1 para la colocalización entre Hsc70 y los antígenos de rotavirus en las vellosidades de los ratones que habían sido infectados y el mismo valor para los infectados y tratados con pioglitazona. Este valor corresponde, para ambos casos, a lo hallado en los diferentes tiempos analizados (12, 24, 36 y 48 h.p.i.), indicando una correlación aleatoria. Como control se analizó la colocalización entre el núcleo y la proteína Hsc70 citoplasmática encontrándose un coeficiente de correlación de -0.1 y entre el núcleo y los antígenos de rotavirus (se expresan solo en citoplasma) cuyo coeficiente de colocalización de Pearson fue de 0,03 en los tres grupos de ratones (no infectados, infectados y los tratados con pioglitazona) en las diferentes h.p.i., indicando que hay una correlación aleatoria (Figura 5-16G). Resultados realizados por duplicado.

**Figura 5-16:** La expresión de Hsc70 cambia en vellosidades intestinales aisladas o extraídas de ratones ICR infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona en el modelo *in vivo* e *in vitro*. **A.** Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de Hsc70 en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo. (Ver tamaño real anexo Q) **B.** ELISA y conteo del porcentaje de expresión de la proteína Hsc70, evaluada por inmunofluorescencia modelo *in vivo*. El conteo se realizo utilizando el programa ImageJ. **C.** Cálculo de la fluorescencia total corregida (CTCF) por medio del programa ImageJ. Modelo *in vivo*. **D.** Citometría de flujo, expresión de los antígenos virales de color verde y expresión de la proteína celular Hsc70 color azul. Modelo *in vivo*. **E.** ELISA y conteo del porcentaje de expresión de Hsc70, evaluadas por inmunofluorescencia modelo *in vitro*. El conteo se realizó utilizando el programa ImageJ. **F.** Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular Hsc70. (Ver tamaño real anexo R) **G.** Calculo de la colocalización entre las proteínas mediante el coeficiente de correlación de Pearson, utilizando el programa ImageJ.







**5.11. Se puede inhibir la infección en vellosidades aisladas, si se infecta con rotavirus *in vivo* y luego de 48 h.p.i., se extraen las vellosidades y se tratan *in vitro* con pioglitazona.**

Se quiso analizar si cambia la expresión de las proteínas PPAR $\gamma$ , Hsc70 y PDI en las vellosidades aisladas de los ratones que fueron infectados *in vivo* pero posteriormente tratadas con pioglitazona *in vitro*. Igualmente, si este resultado cambia al infectar vellosidades aisladas y luego tratadas con pioglitazona (modelo *in vitro*). Los resultados se analizaron mediante la técnica de ELISA.

En vellosidades aisladas e infectadas *in vitro* tuvieron una absorbancia para los antígenos virales de 0.298; al tratar las vellosidades aisladas primero con pioglitazona y después infectarlas con rotavirus *in vitro* la absorbancia bajó a 0.112 (37.6%). Cuando las vellosidades aisladas fueron primero infectadas y luego tratadas con pioglitazona, la absorbancia fue de 0.230 (77.2%). Las vellosidades aisladas de ratones infectados *in vivo* tuvieron una absorbancia de 0.164, mientras que las vellosidades aisladas de ratones infectados y tratados *in vivo* con pioglitazona la absorbancia fue de 0.105 (64.0%). Cuando se aíslan vellosidades de ratones infectados *in vivo* y luego son tratadas con pioglitazona *in vitro* la absorbancia se disminuye a 0.103 (62.8) los porcentajes se realizaron tomando como 100% la infección en las vellosidades infectadas no tratadas. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon todos los grupos de las vellosidades procedentes de ratones no infectados e infectados tuvieron un  $P < 0.0001$  y la comparación entre los grupos de las vellosidades procedentes de ratones infectados tuvieron un  $P < 0.0001$  con un  $n=6$  para cada grupo evaluado por cada h.p.i., entre los dos experimentos realizados. (Tabla 5-26) (Figura 5-17A).

**Tabla 5-26:** ELISA del modelo *in vivo* e *in vitro*: absorbancia de antígenos virales, evaluando proteínas estructurales

GRUPOS DE VELLOSIDADES	ABSORBANCIA DE (Antígenos virales, evaluando proteínas estructurales)	VARIANZA	% DE DISMINUCIÓN DE LA INFECCIÓN*
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0.000	0.000	
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.000 NS	0.000	
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + VIRUS <i>IN VITRO</i>	0.298***	0.099	
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA + VIRUS <i>IN VITRO</i>	0.112**	0.037	37.6%
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + VIRUS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.230***	0.077	77.2%
VELLOSIDADES INFECTADAS <i>IN VIVO</i>	0.164***	0.055	
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VIVO</i>	0.105*	0.035	64.0%
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.103*	0.034	62.8%

(\*) tomando como 100% la infección en las vellosidades infectadas no tratadas  
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnnett. Color azul compararon todos los grupos de las vellosidades procedentes de ratones no infectados tuvieron un  $P < 0.0001$  y de color rojo comparación entre los grupos de las vellosidades procedentes de ratones infectados tuvieron un  $P < 0.0001$  con un  $n=6$ .

Al evaluar la expresión de la proteína Hsc70 en vellosidades aisladas no infectadas la absorbancia en la expresión de la proteína fue de 0.240 y si las vellosidades no infectadas son tratadas con pioglitazona *in vitro* la absorbancia fue de 0.236. En las vellosidades aisladas e infectadas *in vitro* la absorbancia para Hsc70 fue de 0.333, al tratar estas vellosidades primero con pioglitazona y después infectarlas con rotavirus *in vitro* la absorbancia bajó a 0.239; cuando las vellosidades aisladas fueron primero infectadas y luego tratadas con pioglitazona la absorbancia bajó a 0.175. En el caso de vellosidades aisladas de ratones infectados *in vivo* mostraron una absorbancia de 0.317, mientras que las vellosidades aisladas de ratones infectados y tratados *in vivo* tuvieron una absorbancia de 0.197. Cuando se aíslan vellosidades de ratones infectados *in vivo* y luego son tratadas con pioglitazona *in vitro* la absorbancia bajó a 0.142. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon todos los grupos de las vellosidades procedentes de ratones no infectados e infectados tuvieron un P=0.0046 y la comparación entre los grupos de las vellosidades procedentes de ratones infectados tuvieron un P=0.0004 con un n=6 (Tabla 5-27) (Figura 5-17A).

**Tabla 5-27:** ELISA del modelo *in vivo* e *in vitro*: Absorbancia de la proteína Hsc70.

GRUPOS DE VELLOSIDADES	ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA Hsc70	VARIANZA
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0.240	0.060
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.236 <b>NS</b>	0.059
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + VIRUS <i>IN VITRO</i>	0.333 <b>NS</b>	0.083
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA + VIRUS <i>IN VITRO</i>	0.239 <b>NS</b>	0.060
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + VIRUS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.175 <b>NS</b>	0.044
VELLOSIDADES INFECTADAS <i>IN VIVO</i>	0.317 <b>NS</b>	0.079
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VIVO</i>	0.197 <b>**</b>	0.049
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.142 <b>***</b>	0.035

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. **Color azul** compararon todos los grupos de las vellosidades procedentes de ratones no infectados tuvieron un (P=0.0046) y de **color rojo** comparación entre los grupos de las vellosidades procedentes de ratones infectados tuvieron un P=0.0004 con un n=6.

Al evaluar la expresión de la proteína PDI en vellosidades aisladas no infectadas la absorbancia en la expresión de la proteína fue de 0.147 y si las vellosidades no infectadas son tratadas con pioglitazona *in vitro* la absorbancia fue de 0.332. En las vellosidades aisladas e infectadas *in vitro* la absorbancia para PDI fue de 0.618, al tratar estas vellosidades primero con pioglitazona y después infectarlas con rotavirus *in vitro* la absorbancia bajó a 0.172; cuando las vellosidades aisladas fueron primero infectadas y luego tratadas con pioglitazona la absorbancia bajó a 0.194. En el caso de vellosidades aisladas de ratones infectados *in vivo* mostraron una absorbancia de 0.194, mientras que las vellosidades aisladas de ratones infectados y tratados *in vivo* tuvieron una absorbancia de 0.148. Cuando se aíslan vellosidades de ratones infectados *in vivo* y luego son tratadas con pioglitazona *in vitro* la absorbancia fue de 0.194. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon todos los grupos de las vellosidades procedentes de ratones no infectados e infectados tuvieron un P=<0.0001 y la comparación entre los grupos de las vellosidades procedentes de ratones infectados tuvieron un P=0.1057 con un n=6 (Tabla 5-28) (Figura 5-17A).

**Tabla 5-28:** ELISA del modelo *in vivo* e *in vitro*: absorbancia de la proteína PDI.

GRUPOS DE VELLOSIDADES	ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA PDI	VARIANZA
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0.147	0.037
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.332**	0.083
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + VIRUS <i>IN VITRO</i>	0.618***	0.154
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA + VIRUS <i>IN VITRO</i>	0.172NS	0.043
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + VIRUS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.245NS	0.061
VELLOSIDADES INFECTADAS <i>IN VIVO</i>	0.194NS	0.049
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VIVO</i>	0.148NS	0.037
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.194NS	0.048

Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: \*, \*\*, \*\*\* y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul compararon todos los grupos de las vellosidades procedentes de ratones no infectados tuvieron un (P=<0.0001) y de color rojo comparación entre los grupos de las vellosidades procedentes de ratones infectados tuvieron un P=0.1057 con un n=6.

Al evaluar la expresión de la proteína PPAR $\gamma$  en vellosidades aisladas no infectadas la absorbancia en la expresión de la proteína fue de 0.154 y si las vellosidades no infectadas son tratadas con pioglitazona *in vitro* la absorbancia fue de 0.345. En las vellosidades aisladas e infectadas *in vitro* la absorbancia para PPAR $\gamma$  fue de 0.440, al tratar estas vellosidades primero con pioglitazona y después infectarlas con rotavirus *in vitro* la absorbancia bajó a 0.078; cuando las vellosidades aisladas fueron primero infectadas y luego tratadas con pioglitazona la absorbancia bajó a 0.398. En el caso de vellosidades aisladas de ratones infectados *in vivo* mostraron una absorbancia de 0.188, mientras que las vellosidades aisladas de ratones infectados y tratados *in vivo* tuvieron una absorbancia de 0.129. Cuando se aíslan vellosidades de ratones infectados *in vivo* y luego son tratadas con pioglitazona *in vitro* la absorbancia fue de 0.097. En el análisis estadístico se compararon los grupos para determinar la significancia entre ellos, cuando se compararon todos los grupos de las vellosidades procedentes de ratones no infectados e infectados tuvieron un P=<0.0001 y la comparación entre los grupos de las vellosidades procedentes de ratones infectados tuvieron un P=0.0026 con un n=6 (Tabla 5-29) (Figura 5-17A).

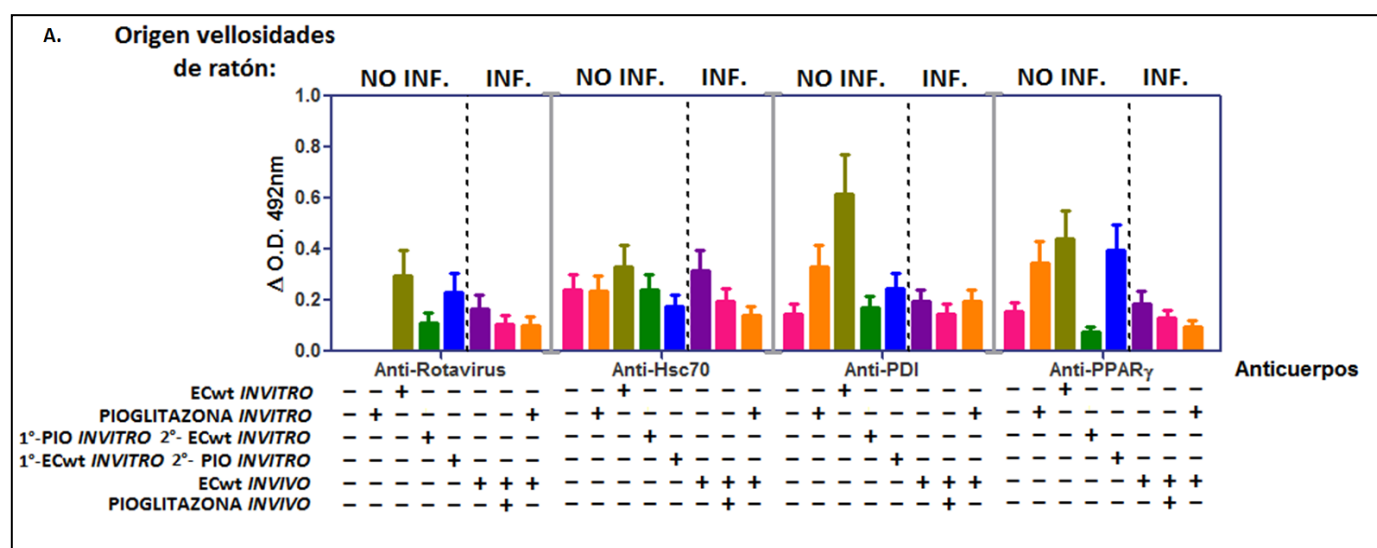
**Tabla 5-29:** ELISA del modelo *in vivo* e *in vitro*: absorbancia de la proteína PPAR $\gamma$ .

GRUPOS DE VELLOSIDADES	ABSORBANCIA DE LA PROTEÍNA PPAR $\gamma$	VARIANZA
VELLOSIDADES NO INFECTADAS	0.154	0.039
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.345**	0.086
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + VIRUS <i>IN VITRO</i>	0.440***	0.110
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + PIOGLITAZONA + VIRUS <i>IN VITRO</i>	0.078NS	0.020
VELLOSIDADES NO INFECTADAS + VIRUS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.398***	0.099
VELLOSIDADES INFECTADAS <i>IN VIVO</i>	0.188NS	0.047
VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VIVO</i>	0.129*	0.032

VELLOSIDADES INFECTADAS + PIOGLITAZONA <i>IN VITRO</i>	0.097***	0.024
Comparación de significancia de los grupos, nivel de significancia: *, **, *** y NS (no significativo). Análisis de ANOVA de una vía, Prueba de múltiple comparación de Dunnett. Color azul compararon todos los grupos de las vellosidades procedentes de ratones no infectados tuvieron un (P=<0.0001) y de color rojo comparación entre los grupos de las vellosidades procedentes de ratones infectados tuvieron un P=0.0026 con un n=6.		

Los resultados son el promedio de dos experimentos cada uno medido por duplicado. Se aplicó en cada pozo de la placa de ELISA aproximadamente 18.76mg/ml de proteína total.

**Figura 5-17:** Se puede inhibir la infección en vellosidades aisladas, si se infecta con rotavirus *in vivo* y luego de 48 h.p.i., se extraen las vellosidades y se tratan *in vitro* con pioglitazona. A. ELISA de la expresión de proteínas estructurales de rotavirus y proteínas celulares Hsc70, PDI y PPAR $\gamma$ . Modelo combinado *in vivo e in vitro*.



## 5.12. Al activar PPAR $\gamma$ con pioglitazona se disminuye la infección probablemente porque disminuye la cantidad de viriones formados.

Al activar PPAR $\gamma$  con pioglitazona se disminuye la infección de rotavirus. Es probable que esto ocurra porque se interfiere con la formación de viriones o se disminuye la cantidad de los mismos. Para esto, se hizo un ensayo de reinfección, con el supuesto que para el primer caso no deberíamos encontrar reinfección, pero si antígenos detectados por las técnicas empleadas anteriormente. Para el segundo caso, lo esperado es encontrar capacidad de reinfección pero disminuida respecto a las células donde no se activó PPAR $\gamma$ . Para esto, vellosidades infectadas con Ecwt, tratadas o no con pioglitazona y cosechadas en las diferentes horas (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h.p.i.) fueron congeladas y descongeladas dos veces, activadas con tripsina y el lisado se adicionó a vellosidades no infectadas que fueron cosechadas a las 12 h.p.i. El resultado se analizó mediante

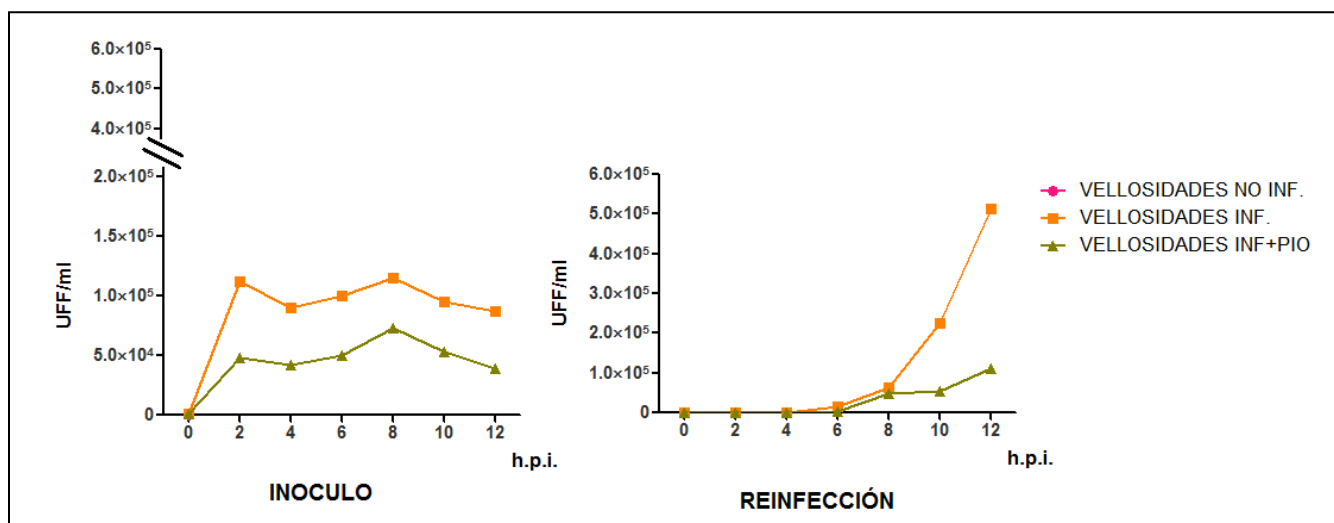


inmunocitoquímica (Figura 5-18) y se graficó como unidades formadoras de foco/ml (UFF/ml) (Tabla 5-30).

**Tabla 5-30:** Unidades formadoras de foco/ml (UFF/ml)

GRUPOS DE VELLOSIDADES		REINFECCIÓN UFF/ml	DESVIACIÓN ESTANDAR	INOCULO UFF/ml	DESVIACIÓN ESTANDAR
VELLOSIDADES NO INF		0	0	0	0
VELLOSIDADES INF	0 h.p.i.	0	0	1500	22.4
	2 h.p.i.	75	5.0	111900	193.1
	4 h.p.i.	1100	19.1	90300	173.5
	6 h.p.i.	16000	73.0	100200	182.8
	8 h.p.i.	64000	146.1	115500	196.2
	10 h.p.i.	224000	273.1	95400	178.3
	12 h.p.i.	512000	413.1	86700	170.0
VELLOSIDADES INF + PIO	0 h.p.i.	0	0	1500	22.4
	2 h.p.i.	62.5	4.6	47700	126.1
	4 h.p.i.	150	7.1	42000	118.3
	6 h.p.i.	2300	27.7	50400	129.6
	8 h.p.i.	47800	126.2	73500	156.5
	10 h.p.i.	55600	136.1	53100	133.0
	12 h.p.i.	111200	192.5	39600	114.9

**Figura 5-18:** Al activar PPAR $\gamma$  con pioglitazona se disminuye la infección probablemente porque disminuye la cantidad de viriones formados. A. Datos de las unidades formadoras de foco/ml de la reinfección y del inoculo.



## 6. Discusión

Investigaciones anteriores indican que hay fármacos eficientes en combatir la infección de rotavirus tanto *in vitro* en líneas celulares(10, 72), como *in vivo* en ratones lactantes ICR (8) y en niños(86). Igualmente, se ha encontrado que los agonistas del factor de transcripción PPAR $\gamma$ , vitamina C, ibuprofeno y diclofenaco, disminuyen la infección del rotavirus, aunque en menor porcentaje que NAC(8, 72). También se conoce que los agonistas pioglitazona y rosiglitazona tienen efectos anti-inflamatorios porque inhiben la activación de NF $\kappa$ B(8). Se ha propuesto que al modular la expresión de PPAR $\gamma$  disminuye la respuesta inflamatoria a virus como influenza, en virtud del papel antagonista de la actividad de la vía NF $\kappa$ B, AP1 y STAT(87). Igualmente, se conoce que PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  regulan la respuesta inflamatoria *in vivo* e *in vitro*(88).

Para este trabajo se diseñaron tres tipos de modelos experimentales: *in vivo*, *in vitro* y el modelo combinado (*in vivo e in vitro*). Al desarrollar el modelo *in vivo*, se analizó que este tenía algunas limitaciones, como no saber si la pioglitazona está actuando en el primer paso, al ingresar al enterocito durante la absorción, o como metabolito al regresar al enterocito de la circulación sanguínea, post-absorción. Tampoco se puede descartar la respuesta inmune del ratón o si durante el procedimiento realizado de extracción de vellosidades se están perdiendo algunas vellosidades o si éstas son eliminadas en las heces por el ratón. Por este motivo se diseñó el modelo *in vitro*, que permitió el análisis de infección en tiempos más cortos, el fármaco no se retira, no hay sistema inmunológico y no hay pérdida celular (Figuras No.4-4 y 4-5).

El resultado de la inmunocitoquímica y del ELISA en el modelo *in vivo* e *in vitro* mostró que los ratones a los que se les administró pioglitazona disminuyó la presencia de antígenos virales, comparados con aquellos que solamente fueron infectados (Figuras No. 5-7A-E) sugiriendo que al administrar pioglitazona se activan vías o factores que podrían estar implicados en inhibir el proceso infeccioso del virus o en inhibir vías o factores necesarios para el proceso infeccioso de rotavirus.

La literatura ha reportado que las proteínas NSP5 se localizan en los viroplasmos, cuerpos de inclusión citoplasmáticos presentes en las células infectadas por rotavirus, lo que indica su participación en el proceso replicativo de estos virus. NSP5 interactúa con NSP2 hiperfosforilándolo y aparentemente, de esta manera está involucrado en el inicio de la formación del viroplasma, “estructura” necesaria para que ocurra la replicación y traducción de proteínas virales (15). Una vez que se acumula una masa crítica de proteínas virales, de 3 a 4 horas después de la infección, se forman en el citoplasma celular estructuras electrodensas llamadas viroplasmos, por esta razón NSP5 está entre las proteínas que el virus debe expresar tempranamente para formar el viroplasma, puesto que NSP5 participa de este evento(28), lo cual explica porque NSP5 en ratones y/o vellosidades infectadas aumenta tempranamente (Figura 5-7). Al realizar el análisis de los antígenos virales, evaluando proteínas estructurales en el modelo *in vitro* se observó que en las diferentes horas pos-infección el porcentaje de infección no tiene grandes diferencias, puesto que no hay un aumento progresivo en la infección. Este comportamiento es típico de una mezcla de vellosidades aisladas íntegras y células desprendidas de estas; lo cual sugiere que durante el procedimiento de extracción se obtuvieron vellosidades con disgregación parcial de enterocitos y una vez que se desprenden entran en muerte celular programada denominada “anoikis” lo cual impide la reinfección de enterocitos, como ha sido ya reportado(35) (Figura 5-7E y anexo S); sin embargo la viabilidad durante los tiempos examinados se mantuvo alta porque se tuvo en cuenta solamente las vellosidades y no las células desprendidas cuya mortalidad inicia a las dos horas del desprendimiento de la vellosidades como se mencionó anteriormente, siendo concordante con lo que se encuentra en la literatura(92).

Se sabe que pioglitazona activa a PPAR $\gamma$  (50-52); por esto, se quiso investigar cómo varía la expresión de PPAR $\gamma$  ante la infección por rotavirus y cuando se aplica pioglitazona. Se encontró que en los modelos *in vivo* e *in vitro* la expresión de PPAR $\gamma$  aumenta en vellosidades aisladas e infectadas o procedentes de ratones infectados *in vivo* y dicha expresión disminuye cuando se infectan y se tratan con pioglitazona en comparación con los ratones o las vellosidades aisladas que solo fueron infectados. El resultado fue similar evaluado mediante inmunofluorescencia, ELISA y citometría de flujo (Figura No.5-8A-E). Cuando se analizaron los cortes histológicos por microscopía confocal e inmunofluorescencia para esta proteína se observó que hay una correlación aleatoria según el coeficiente de correlación de Pearson (Figura No.5-9 A,B), sugiriendo que en el plano focal analizado los antígenos virales de rotavirus y PPAR $\gamma$  no tienen contacto directo; en vellosidades disgregadas de estos mismos ratones se observa que en el citoplasma la proteína PPAR $\gamma$  queda acumulada en los ratones infectados y cuando estos ratones infectados son tratados con pioglitazona la expresión de esta proteína disminuye. En el núcleo la expresión de la proteína también disminuye como ocurre en el citoplasma (Figura No.5-9C, D). En general, esto sugiere que PPAR $\gamma$  aumenta porque puede ser necesario para la infección o como mecanismo de defensa de la célula para inhibir la infección. Disminuye con pioglitazona porque al activarse PPAR $\gamma$  se inhiben factores necesarios para la infección o inhibe vías proinflamatorias(93) y como respuesta la célula reduce la proteína PPAR $\gamma$ .

Otros autores reportaron que infecciones virales causadas por el virus de la hepatitis C induce acumulación de lípidos en las células hepáticas, en donde NS5A aumenta la actividad transcripcional y la expresión génica de PPAR $\gamma$ (94), sin embargo también se ha reportado que al activar la proteína PPAR $\gamma$  con diferentes agonistas, suprime la replicación de virus como HIV-1(95) y virus sincitial respiratorio (RSV)(96)

Una de las vías proinflamatorias que podría estar inhibiendo PPAR $\gamma$  es la vía de NF $\kappa$ B (93). Por esto que se quiso analizar si el tratamiento con pioglitazona afecta la expresión de NF $\kappa$ B en vellosidades infectadas con rotavirus. En los modelos *in vivo* e *in vitro* se analizó la expresión de NF $\kappa$ B y NF $\kappa$ B-p por medio de los ensayos de inmunofluorescencia, ELISA y Citometría de flujo. Con las tres técnicas se observó que la expresión de la proteína NF $\kappa$ B y NF $\kappa$ B-p aumentó con la infección del rotavirus, respecto a células no infectadas y disminuyó en células procedentes de ratones infectados y tratados con pioglitazona respecto a las células procedentes de los ratones que solo fueron infectados (Figura No. 5-10D-F). Se ha reportado que rotavirus activa a NF $\kappa$ B porque VP4 se une al factor 2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF2) a través de la secuencia conservada PXQXT (64) Cuando se analizaron los cortes histológicos para esta proteína se observó que hay una correlación aleatoria (Figura No.5-11A,B) sugiriendo que en el plano focal analizado los antígenos virales y NF $\kappa$ B-p no interactúan; en vellosidades disgregadas de estos mismos ratones se observa que la proteína NF $\kappa$ B queda acumulada en el citoplasma cuando los ratones han sido infectados, concordando con un reporte previo(97), aparentemente porque la proteína no estructural NSP1 bloquea la degradación del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ . En los ratones infectados y tratados con pioglitazona se observó que la expresión de la proteína en el citoplasma disminuye y en el núcleo se mantiene sin cambios aparentes (Figura No.5-11C, D). Lo anterior sugiere que NF $\kappa$ B aumenta por que es necesario para el proceso infeccioso puesto que NSP1 y NSP4 lo aumentan (67-68). No se descarta que también pueda estar influyendo la respuesta inmune de la célula frente al virus(98); disminuye con pioglitazona porque al activarse PPAR $\gamma$  este inhibe a NF $\kappa$ B(93), necesario para el proceso infeccioso.

En la literatura se ha encontrado que NF $\kappa$ B se encuentra en estado latente en el citoplasma unido a por el complejo I $\kappa$ B, impidiendo que NF $\kappa$ B se fosforile y se trasloque al núcleo(59). Por esto se quiso saber si varía la expresión de la proteína celular I $\kappa$ B en vellosidades intestinales extraídas de

ratones ICR que han sido infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona a diferentes horas post-infección. La expresión de I $\kappa$ B se evaluó por medio de ELISA y microscopia confocal. En el ensayo de ELISA se observó que los resultados no son claramente diferentes entre el ratón no infectado, el infectado y los tratados, probablemente por error técnico del ELISA directo, como se explicó anteriormente (Figura No.5-12A). Cuando se analizaron los cortes histológicos por microscopía confocal para esta proteína se observaron diferencias entre los grupos de ratones analizados, con una correlación aleatoria entre la proteína y el virus (Figura No.5-12B, C). Es probable que I $\kappa$ B aumente porque NSP1 bloquea su degradación en células infectadas y disminuye cuando es degradado vía proteasoma, al disminuir NSP1 porque se disminuye la infección. Cuando se activa PPAR $\gamma$  con pioglitazona este inhibe la activación de I $\kappa$ B(93) y la liberación de NF $\kappa$ B del complejo.

Cuando se activa NF $\kappa$ B por fosforilación, éste se trasloca al núcleo y activa genes proinflamatorios como Cox-2(62), por esta razón se quiso investigar si la expresión de Cox-2 varía en vellosidades intestinales extraídas de ratones ICR que han sido infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona a diferentes horas post-infección. En los modelos *in vivo* e *in vitro* el resultado se evaluó por inmunofluorescencia, citometría de flujo y microscopia confocal; en los dos modelos se observó que Cox-2 aumenta en células infectadas respecto a las no infectadas y en las células de ratones infectados y tratados con pioglitazona la expresión de la proteína disminuye en comparación con las células de los ratones que fueron infectados solamente (Figura No.5-13A-E). Esto sugiere que Cox-2 aumenta porque NF $\kappa$ B está activo y disminuye al administrar pioglitazona porque al activarse PPAR $\gamma$  se inhibe NF $\kappa$ B y esto reduce la expresión de Cox-2.

Se ha reportado que la infección por virus genera aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno(99), entonces se quiso saber si varía la producción de ROS en vellosidades intestinales extraídas de ratones ICR infectados y tratados con pioglitazona a diferentes horas post-infección. En el modelo *in vivo* e *in vitro* se observó que ROS aumenta en células infectadas respecto a las no infectadas y en las células de ratones infectados y tratados con pioglitazona la expresión de la proteína disminuye en comparación con las células de los ratones que fueron infectados solamente. (Figura No.5-14 A-D). Esto sugiere que la infección por virus genera el aumento en la producción de ROS(100) por acción directa o indirecta y esto podría explicar la activación de NF $\kappa$ B(101); por otra parte, el aumento de Cox-2 puede contribuir a aumentar ROS (71). Disminuye porque al activar PPAR $\gamma$  con pioglitazona se inactiva NF $\kappa$ B, se activa la vía ERK/2 y quizá la biogénesis mitocondrial activando PCG-1 $\alpha$ , dando como resultado la disminución de los factores relacionados con la generación de ROS(101-102).

Se ha reportado que en el aumento de ROS la célula sobreexpresa PDI (37-38); también se sabe que PDI aumenta ante la infección por rotavirus porque es necesaria para el ingreso (32, 36) y ensamblaje del rotavirus (40-41); teniendo en cuenta lo anterior se quiso investigar si varía la expresión de PDI en vellosidades intestinales extraídas de ratones ICR que han sido infectados con rotavirus y tratados con pioglitazona a diferentes horas post-infección. Los resultados se evaluaron por inmunofluorescencia, ELISA, citometría de flujo y microscopia confocal. Se observó, *in vivo* e *in vitro*, que PDI aumenta en células infectadas respecto a las no infectadas y en las células de ratones infectados y tratados con pioglitazona la expresión de la proteína disminuye en comparación con las células de los ratones que fueron infectados solamente (Figura No.5-15A-E). Cuando se analizaron los cortes histológicos por microscopia confocal e inmunofluorescencia para esta proteína se observó que hubo una correlación aleatoria (Figura No. 5-15A, B). En general sugiere que PDI aumenta porque puede estar interactuando con rotavirus o como mecanismo de defensa celular por el aumento de ROS y disminuye con pioglitazona porque al activarse PPAR $\gamma$  se inhibe NF $\kappa$ B y esto da como resultado la disminución de Cox-2 y de ROS.

Adicionalmente, el aumento de las EROS o ROS podría ocasionar desnaturalización de las proteínas por acción de los radicales libres y la célula incrementa la expresión de proteínas como PDI y las de choque térmico, entre ellas Hsc70. Por esta razón se analizó la expresión de Hsc70 mediante inmunofluorescencia, ELISA, citometría de flujo y microscopia confocal. Se observó, *in vivo* e *in vitro*, que Hsc70 aumenta en células infectadas respecto a las no infectadas y en las células de ratones infectados y tratados con pioglitazona la expresión de la proteína disminuye en comparación con las células de los ratones que fueron infectados solamente (Figura No.5-16A-E). Cuando se analizaron los cortes histológicos para esta proteína y se analizaron por microscopia confocal se observó que hubo una correlación aleatoria (Figura No.5-16A, B). En general, sugiere que Hsc70 aumenta porque rotavirus puede estar utilizando a Hsc70 para su proceso infeccioso, o estar ejerciendo un papel protector contra la sobreproducción de ROS y disminuye con pioglitazona porque al activarse PPAR $\gamma$  se inhibe NF $\kappa$ B, disminuyendo Cox-2, ROS y por lo tanto Hsc70.

Se diseñó un método combinado *in vitro* e *in vivo* para saber si la pioglitazona podría frenar el proceso infeccioso que se inició *in vivo*. Para esto, a ratones ICR infectados *in vivo* se les aisló las vellosidades y se adicionó pioglitazona *in vitro*; estos resultados se compararon con resultados de las vellosidades infectadas *in vitro* y tratadas también *in vitro*. Se analizaron los antígenos de rotavirus, las proteínas Hsc70, PDI y PPAR $\gamma$  por ELISA. Se observó, que Hsc70, PDI y PPAR $\gamma$  aumentan en células infectadas respecto a las no infectadas y en las células de ratones infectados y tratados con pioglitazona la expresión de la proteína disminuye en comparación con las células de los ratones que fueron infectados solamente. Como control se utilizaron las vellosidades extraídas de ratones infectadas y tratadas con pioglitazona *in vivo* en donde también se observó que la expresión de estas proteínas y de los antígenos virales disminuye. Al realizar el mismo procedimiento en vellosidades aisladas infectadas *in vitro* y tratadas también *in vitro* se observó que la expresión de las proteínas disminuían en comparación con las vellosidades aisladas que solo fueron infectadas *in vitro*. También se observó que a vellosidades aisladas y tratadas primero con pioglitazona y luego infectadas también hubo disminución de la expresión de estas proteínas (Figura No.5-17A). En general, estos resultados apoyan lo descrito para los modelos analizados independientemente e indica que el proceso infeccioso iniciado *in vivo* puede continuar *in vitro*, disminuyendo la infección cuando se trata *in vitro* con pioglitazona. Otro resultado interesante que mostró este modelo es que al activar PPAR $\gamma$  antes de la infección puede haber un efecto protector de la infección por rotavirus. Esto sugiere que la activación de PPAR $\gamma$  inhibe factores necesarios para la infección, por ejemplo, la vía proinflamatoria, aunque con estos experimentos no se aclara, si se interfiere con la formación de viriones o con la cantidad de los mismos. Para discriminar esto, se hizo un ensayo de reinfección (Figura No. 5-18) encontrándose que la activación de PPAR $\gamma$  disminuye el número de viriones formados pero no la formación de estos; esto sugiere que PPAR $\gamma$  inhibe factores celulares necesarios en el proceso infeccioso específicamente en el rendimiento viral (probablemente disminuye la eficacia del ensamblaje).

## 7. Conclusiones

La entrada del rotavirus a la célula induce la expresión de algunos factores celulares (ROS, PPAR $\gamma$ , NF $\kappa$ B, COX-2, PDI y Hsc70) que benefician el proceso infeccioso o como respuesta celular ante la infección y al activar PPAR $\gamma$  con un agonista (pioglitazona) se inhiben estos, y probablemente otros factores no estudiados, dando como resultado la disminución de la infección, por disminución del número de viriones formados, sin afectar su formación.

- **Aportes del trabajo al conocimiento sobre rotavirus**

Se confirma que al activar PPAR $\gamma$  con pioglitazona disminuye la infección. Aporta que este efecto ocurre desde tempranas horas post- infección (in vitro) y el fenómeno se mantiene mientras se mantiene el tratamiento, por ejemplo, hasta las 48 horas (In vivo).

Aporta conocimiento sobre rotavirus y su relación con vías celulares necesarias para su proceso infeccioso. Así, apoya que cuando se infecta la célula con rotavirus las proteínas celulares estudiadas (PPAR $\gamma$ , NF $\kappa$ B, Cox-2, PDI y Hsc70) aumenta su expresión y disminuyen al activar PPAR $\gamma$  con pioglitazona (datos obtenidos por diferentes técnicas inmunológicas). Aporta que este efecto ocurre desde tempranas horas post- infección (In vitro) y el fenómeno se mantiene mientras se mantiene el tratamiento, por ejemplo, hasta las 48 horas (In vivo).

Aporta resultados respecto a la localización de la proteína PPAR $\gamma$  y NF $\kappa$ B en el enterocito durante el proceso infeccioso (aumentan y se localizan en el citoplasma) y al activarse PPAR $\gamma$  con pioglitazona (se redistribuyen similar a una célula no infectada). Sugiere que la relación rotavirus y las proteínas celulares estudiadas es indirecto puesto que no colocan las proteínas celulares y las proteínas virales.

Se reporta por primera vez que la infección con rotavirus induce aumento de las especies reactivas de oxígeno (EROS o ROS) y disminuyen cuando se activa PPAR $\gamma$  con pioglitazona; sugiriendo que para el proceso infeccioso exitoso el virus requiere un ambiente oxidativo y que PPAR $\gamma$  puede estar implicado en mecanismos antioxidativos a nivel celular, puesto que al activarlo los ROS disminuyen.

Se reporta por primera vez que la activación de PPAR $\gamma$  antes de la infección con rotavirus aporta, disminuye la infección, sugiriendo que hay una condición preventiva contra la infección.

El trabajo en su conjunto aporta que PPAR $\gamma$  activo antagoniza las vías proinflamatorias como NF $\kappa$ B-Cox-2.

Por la infección del rotavirus se induce la expresión de PPAR $\gamma$ , probablemente porque no está activo y puede reflejarse como un mecanismo de defensa celular.

## 8. Recomendaciones

Se requiere comparar estos resultados con otros agonistas de PPAR $\gamma$  como Rosiglitazona, Tiazolidinediona, DHA, ALA y HODE y otros medicamentos como NAC para observar si el efecto es similar a lo anteriormente presentado. Al concluir este trabajo, se están investigando si los reactivos mencionados ejercen igual efecto que pioglitazona. Los datos preliminares apoyan los resultados obtenidos con pioglitazona.

## Bibliografía

1. World Health Organization. (2011) Rotavirus.
2. Parashar, U., Gibson CJ, Bresee JS and Glass RI. (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea, *Emerging Infectious Diseases* 12, 304-306.
3. Cáceres Diana, C., Peláez Dioselina, Sierra Nubia, Estrada Eduardo y Sánchez Luis. (2006) La carga de la enfermedad por rotavirus en niños menores de cinco años, Colombia, 2004, *Revista Panamericana de la Salud Publica* 20, 9-21.
4. Cáceres Diana, C., Velandia Martha Patricia, Izquierdo Vilma Fabiola y Boshell Jorge. (2003) Informe Epidemiológico. Enfermedad diarreica aguda e infección por rotavirus, Colombia, agosto de 2003., *Instituto Nacional de Salud* 8.
5. Ruiz-Palacios Guillermo, M., Pérez-Schael Irene and co. (2006) Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe Rotavirus gastroenteritis, *The New England Journal of Medicine* 354, 11-22.
6. Rheingans, R. D., Dagna Constenla, Lynn Antil, Bruce L. Innis and Thomas Breuer. (2007) Economic and health burden of rotavirus gastroenteritis for the 2003 birth cohort in eight Latin American and Caribbean countries, *Rev Panam Salud Publica* 21, 192-204.
7. Payne, D., Staat MA, Donauer S, Weinberg GA, Edwards KM, Szilagyi PG, Griffin MR, Hall CB, Curns AT, Gentsch JR, Salisbury S, Fairbrother G and Parashar UD. (2011) Effectiveness of pentavalent rotavirus vaccine against severe disease, *Pediatrics* 128, 267-275.
8. Guerrero, C. A., Pardo Paula, Rodriguez Victor, Guerrero R. Rafael and Acosta Orlando. (2013) Inhibition of rotavirus ECwt infection in ICR suckling mice by N-acetylcysteine, PPAR $\gamma$  and COX-2 inhibitors, *Submitting Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*.
9. Calderon, M. N., Guerrero C.A., Acosta O., Lopez S., Arias C.F. (2012) Inhibiting rotavirus infection by membrane-impermeant thiol/disulfide exchange blockers and antibodies against protein disulfide isomerase, *Intervirology*.
10. Guerrero, C. A., Murillo A. y Acosta O. (2012) Inhibition of rotavirus infection in cultured cells by N-acetyl-cysteine, PPAR $\gamma$  agonists and NSAIDs, *Antiviral Res* 96, 1-12.
11. Romero Cabello Raúl (2007) *Microbiología y parasitología humana*, Vol. 3, Panamericana, Mexico.
12. Pesavento, J., Crawford SE., Estes MK. and Venkataram Prasad BV. (2006) Rotavirus Proteins: Structure and Assembly, *CTMI* 309, 189–219.
13. Estes, M. K., and J. Cohen. (1989) Rotavirus gene structure and function, *Microbiol. Rev.* 53, 410.
14. Zarate, S., Pedro Romero, Rafaela Espinosa, Carlos F. Arias, and Susana López. (2004) VP7 Mediates the Interaction of Rotaviruses with Integrin  $\alpha v \beta 3$  through a Novel Integrin-Binding Site, *J. Virol.* 78, 10839.
15. Contin, R., Arnoldi F., Campagna M. and Burrone O. R. (2010) Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins, *Journal of General Virology* 91, 1782.
16. Arias, C., Romero P., Alvarez V. and López S. (1996) Trypsin Activation Pathway of Rotavirus Infectivity, *J. Virol.* 70, 5832.
17. Estes, M., Graham DY., Gerba CP. and Smith EM. (1979) Simian Rotavirus SAI Replication in Cell Cultures, *J. Virol.* 31, 810.
18. Sue, E. C., Sharmila K. Mukherjee, Mary K. Estes, Jeffery A. Lawton, Andrea L. Shaw, Robert F. Ramig and BV. Venkataram Prasad. (2001) Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike, *J. Virol.* 75, 6052.



19. Sánchez-San Martín, C., Tomás López, Carlos F. Arias, and Susana López. (2004) Characterization of Rotavirus Cell Entry, *J. Virol.* 78, 2310.
20. Gutierrez Michelle, I. P., Sánchez-San Martín Claudia, Pérez-Vargas Jimena, Espinosa Rafaela, Arias Carlos F. and López Susana. (2010) Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis., *J. Virol.* 84, 9161.
21. Zárata, S., Mariela A. Cuadras, Rafaela Espinosa, Pedro Romero, Karla O. Juárez, Minerva Camacho-Nuez, Carlos F. Arias, and Susana López. (2003) Interaction of Rotaviruses with Hsc70 during Cell Entry Is Mediated by VP5, *J. Virol.* 77, 7254.
22. Kim, I., Trask SD., Babyonyshev M., Dormitzer PR., Harrison SC. (2010) Effect of mutations in VP5\* hydrophobic loops on rotavirus cell entry, *J Virol* 84.
23. Fuentes - Panama Ezequiel, M., López Susana, Gorziglia Mario y Arias Carlos F. (1995) Mapping the Hemagglutination Domain of Rotaviruses, *J. Virol.* 69, 2629.
24. Guerrero, C. A., Méndez Ernesto, Susana López, Carlos F. Arias Pavel Isa, Tomás López, Rafaela Espinosa, Pedro Romero, Daniela Bouyssounade and Selene Zárata. (2002) Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry, *J. Virol.* 76, 4096.
25. Guerrero, C. A., Selene Zárata, Gabriel Corkidi, Susana López and Carlos F. Arias. (2000) Biochemical Characterization of Rotavirus Receptors in MA104 Cells, *J. Virol.* 74, 9362.
26. Tavaría, M., Gabriele T, Kola I, Anderson RL. (1996) A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family, *Cell Stress Chaperones* 1, 23–28.
27. Morano, K. (2007) New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1113, 1-14.
28. Rojas, M., Ayala-Breton Camilo y López Susana. (2008) Biología molecular de rotavirus: una mirada a través de la interferencia de RNA, *Mensaje Bioquímico* 32, 149-162.
29. López, T., Camacho Minerva, Zayas Margarita, Nájera Rebeca, Sánchez Rosana, Arias Carlos F. and López Susana. (2005) Silencing the Morphogenesis of Rotavirus, *J Virol.* 79.
30. Ritossa, F. (1996) Discovery of the heat shock response, *Cell Stress Chaperones* 1, 97-98.
31. Haus, U., Trommeler P, Hartmann H, Lottpeich F, Noegel A, Schleicher M. (1993) The heat shock cognate protein from Dictyostelium affect actin polymerization through interaction with the actin-binding protein cap32/34. , *J Embo* 12, 3763-3771.
32. Flaherty, K., Mckay DB, Kabsch W, Holmes KC. (1999) Similarity of the tree-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein, *Pro. Natl. Acad.* 88, 5041 - 5045.
33. Wu, S., Liu FH, Hu SM, Wang C. (2001) Different combination of the hsc70 C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetraco-peptide – containing proteins. , *Biochem J* 359, 419-426
34. Guerrero, C. A., Moreno L.P. (2012) Rotavirus receptor proteins Hsc70 and integrin  $\alpha\beta 3$  are located in the lipid microdomains of animal intestinal cells, *Acta virologica* 56, 63-70.
35. Guerrero, C. A., Santana Ana Y and Orlando Acosta. (2010) Mouse intestinal villi as a model system for rotavirus infection studies, *Journal of Virological Methods* 168, 22-30
36. Pulido, D., Acosta O, Guerrero CA. (2007) Increase of heat shock cognate protein, HSC70, in MA104 cells following rotavirus infection, *Rev.Fac.Med* 55, 224-239.
37. Wilkinson, B., Gilbert H.F. (2004) Protein disulfide isomerase, *Biochimica et Biophysica Acta* 1694, 35-44.
38. Gruber, C., Cemazar M., Heras B, Martín JL, Craik DJ. (2006) Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding, *Trends in biochemical sciences* 31, 455–464.
39. Lars, E., Lloyd, W. Ruddock. (2005) The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties, *The Embo* 6, 28-32.

40. Calderón, M. N., Acosta Orlando, Guzman Fanny, Guerrero Carlos A. (2011) Protein disulfide isomerase activity is involved in rotavirus entry to MA104 cells, *Intervirology* 31, 70-81.
41. Avidal, L., Lopez S., Arias CF. (2008) Endoplasmic Reticulum Chaperones Are Involved in the Morphogenesis of Rotavirus Infectious Particles., *J Virol* 82, 5368-5380.
42. Krishnan, A., Nair SA , Pillai MR. (2007) Biología de los PPAR gamma en el cáncer: una revisión crítica de las lagunas existentes. Biology of PPAR gamma in cancer: a critical review on existing lacunae. , *Curr Mol Med.* 7, 532-540.
43. Fajas, L., Debril M.B., Auwerx J. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis, *Journal of Molecular Endocrinology* 27, 1-9.
44. Mangelsdorf, D., Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade., *cell* 83, 835-839.
45. Kliewer, S., Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC and Lehmann JM (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation, *cell* 83, 813-819.
46. Lehmann, J., Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. (1997) Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs, *J Biol Chem* 272, 3406–3410.
47. Stumvoll, M., Häring H. . (2002) Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms, *Ann Med* 34, 217-224.
48. Chinetti, G., Fruchart JC, Staels B. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation, *Inflamm Res* 10, 497-505.
49. Delerive, P., Fruchart JC, Staels B. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control, *J Endocrinol* 169, 453–459.
50. Hernández-Jiménez, S., Carlos A. Aguilar-Salinas, Francisco J. Gómez-Pérez. (2002) Tiazolidinedionas. Beneficios y riesgos reales, *Revista de Endocrinología y Nutrición* 10, 69-76.
51. Taishi, N., Eiichiro Yamamoto, Keiichiro Kataoka, Takuro Yamashita, Yoshiko Tokutomi, Yi-Fei Dong, Shinji Matsuba, Hisao Ogawa, Shokei Kim-Mitsuyama. (2008) Beneficial Effects of Pioglitazone on Hypertensive Cardiovascular Injury Are Enhanced by Combination With Candesartan, *American Heart Association* 51, 296-301.
52. Taishi, N., Eiichiro Yamamoto, Keiichiro Kataoka, Takuro Yamashita, Yoshiko Tokutomi, Yi-Fei Dong, Shinji Matsuba, Hisao Ogawa, Shokei Kim-Mitsuyama. (2007) Pioglitazone Exerts Protective Effects Against Stroke in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats, Independently of Blood Pressure, *Stroke* 38, 3016-3022.
53. Acosta, P., López Segovia, Blé Castillo, A Rodríguez Hernández, D Muñoz Romero, E Acosta Nieto. (2005) Effect of Rosiglitazone and Pioglitazone in combination with Metformin in the control of Diabetes Mellitus type 2, *Universidad y Ciencia* 21, 11-17.
54. Wikimedia Foundation Inc. (2012) Pioglitazone.
55. Tegeder, I., Pfeilschifter J, Geisslinger G. (2001) Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors, *The Fased* 15, 2057-2072.
56. Little, D., Jones S L, Bliklager AT. (2007) Cyclooxygenase (cox) inhibitors and the intestine, *J Vet Intern Med* 21, 367–377.
57. Rodríguez-Díaz J; Banasaz M, I. C., Buesa J, Lundgren O, Espinoza F, Sundqvist T, Rottenberg M, Svensson L. . (2006) Role of nitric oxide during rotavirus infection, *J Med Virol.* 78, 979-985.

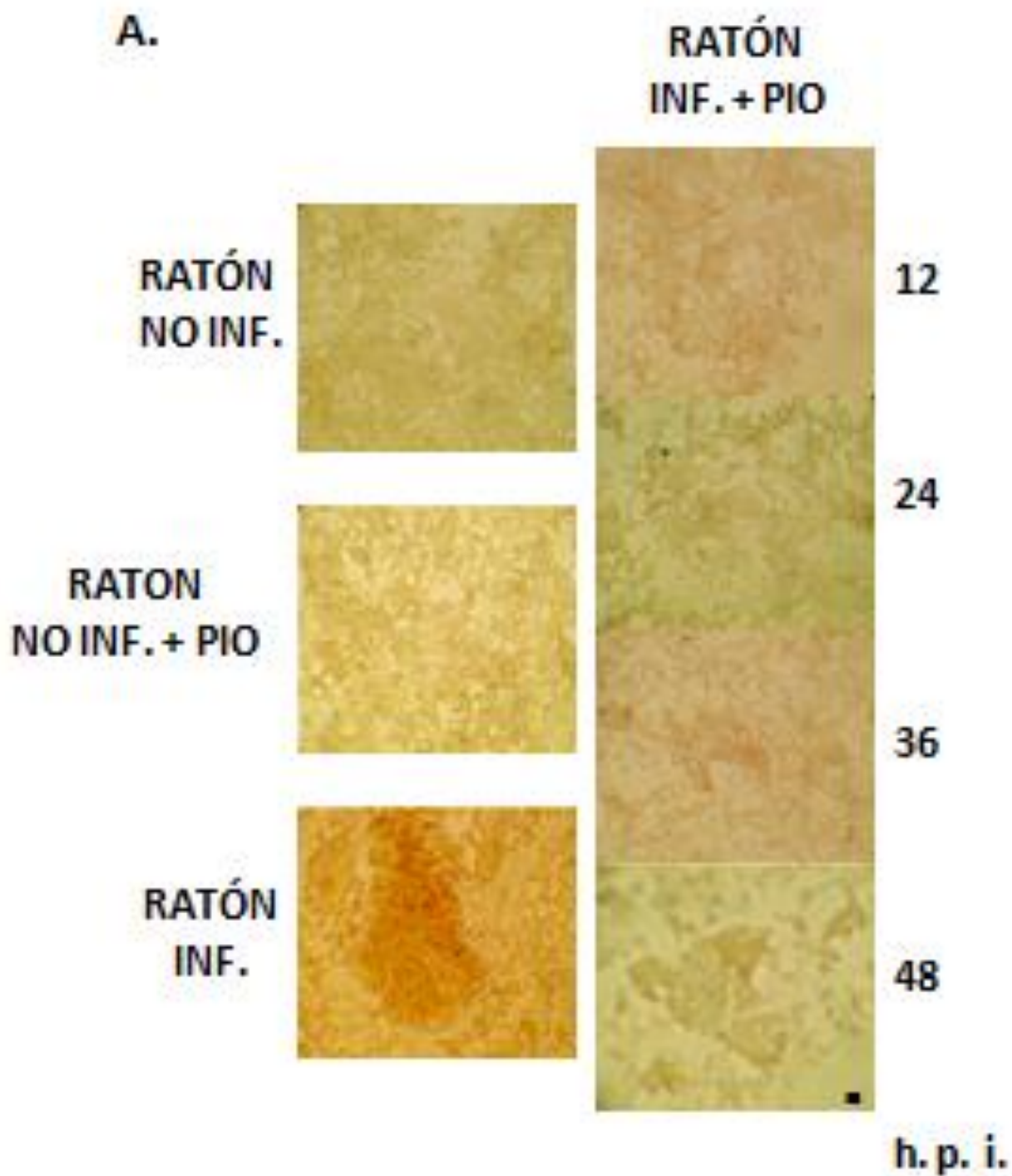
58. Youssef, M. B. (2004) Role of peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control, *J Biomed Biotechnol* 29, 156-166.
59. Ghosh, S., May M. J., Kopp EB. (1998) NF $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses, *Annu. Rev. Immunol* 16, 225-260.
60. Li, Q., Verma IM. (2002) NF-kappaB regulation in the immune system., *Nat Rev Immunol.* 10, 735-734.
61. Bonizzi, G., Karin M. (2004) The two NF $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends Immunol* 25, 280-288.
62. Memet, S. (2006) NF $\kappa$ B functions in the nervous system: From development to disease, *Biochem. Pharmacol.* 72, 1180-1195.
63. Hayden, M. S. (2004) Signaling to NF $\kappa$ B, *Genes Dev* 18, 2195-2224.
64. Amir, R. E., Iwai, K., and Ciechanover, A. (2002) The NEDD8 pathway is essential for SCF( $\beta$ -TrCP)-mediated ubiquitination and processing of the NF- $\kappa$  B precursor p105, *J. Biol. Chem* 277, 23253-23259.
65. Ben-Neriah, Y. (2002) Regulatory functions of ubiquitination in the immune system, *Nat. Immunol.* 3, 20-26.
66. Israel, A. (2004) Biochemical and genetic analysis of the NF- $\kappa$ B signaling pathway, In *In Keystone Symposium on NF- $\kappa$ B: Biology and pathology*, Keystone Symposia, Snowbird Resort, Snowbird, UT.
67. Chen, F., Wang M, O'Connor JP. (2003) Phosphorylation of PPAR $\alpha$  via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF- $\kappa$ B, *J Cell Biochem* 90, 732-744.
68. LaMonica, R., Kocer SS, Nazarova J, Dowling W, Geimonen E, Shaw RD, Mackow ER. (2001) VP4 differentially regulates TRAF2 signaling, disengaging JNK activation while directing NF-kappa B to effect rotavirus-specific cellular responses, *J Biol Chem* 276, 19889-19896.
69. FitzGerald, G. A. (2003) COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease, *Nat Rev Drug Discov* 2, 879-890.
70. Uri, R. M., Inseok Song. (2009) Posttranscriptional and Posttranslational Determinants of Cyclooxygenase Expression, *BMB reports* 42, 552-560.
71. Butterfield, D. A., Howard, B. J., LaFontaine, M. A. (2001) Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease and Huntington's disease, *Curr Med Chem* 8, 815-828.
72. Rossen John, W., Bouma Janneke, Rolien H C Raatgeep, Hans A Büller, Alexandra WC Einerhand. (2004) Inhibition of Cyclooxygenase Activity Reduces Rotavirus Infection at a Postbinding Step, *J Virol.* 78, 9721-9730.
73. Nelson David L. and Cox Michael M. (2009) *Lehninger Principles of biochemistry*, 5 ed., Omega, New York.
74. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (Ed.) (2007) *Antioxidant defences: endogenous and diet derived*, *Free radicals in biology and medicine*, 4 ed., Oxford University Press Inc, New York.
75. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C, (Ed.) (2007) *Oxygen is a toxic gas—an introduction to oxygen toxicity and reactive species*. *Free radicals in biology and medicine*, 4 ed., Oxford University Press Inc, New York.
76. Miller, D. M., Buettner, GR. y Aust, SD, (Ed.) (1990) *Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions*. *Free Radical Biology and Medicine*, New York.
77. Treitinger, A., Spada, C., Verdi, J.C., Miranda, A.F., Oliveira, O.V., Silveira, M.V., Moriel, P., Abdalla, D.S. . (2000) Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus., *J. Clin. Invest* 30, 454-459.

78. Boya, P., de la Peña A., Beloqui O., Larrea E., Conchillo M., Castelruiz Y., Civeira M.P., Prieto J. (1999) Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C., *J. Hepatol.* 31, 808–814.
79. Dikici, I., Mehmetoglu, I., Dikici, N., Bitirgen, M., Kurban, S. (2005) Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon-alpha treatment, *Clin. Biochem* 38, 1141–1144.
80. Dobmeyer, T. S., Findhammer, S., Dobmeyer, J.M., Klein, S.A., Raffel, B., Hoelzer, D., Helm, E.B., Kabelitz, D., Rossol, R. (1997) Ex vivo induction of apoptosis in lymphocytes is mediated by oxidative stress: role for lymphocyte loss in HIV infection., *Free Radic. Biol. Med* 22, 775-785.
81. Knobil, K., Choi, A.M., Weigand, G.W., Jacoby, D.B. (1998) Role of oxidants in influenza virus-induced gene expression, *Am. J. Physiol* 274, 134-142.
82. Korenaga, M., Wang T., Li Y., Showalter LA., Chan T., Sun J., Weinman SA. (2005) Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production, *J. Biol. Chem* 280, 37481-37488.
83. Skulachev, V. P. ( 1998) Possible role of reactive oxygen species in antiviral defense, *Biochemistry (Mosc)* 63, 1438-1440.
84. Decramer, M., Rutten-van Mólken M , Dekhuijzen PN , Troosters T , van Herwaarden C , Pellegrino R , van Schayck CP , Olivieri D , Del Donno M , De Backer W , Lankhorst I , Ardia A. (2005) Efectos de la N-acetilcisteína sobre los resultados en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (bronquitis aleatorizado en el NAC coste-utilidad del estudio, BRONCUS): un estudio aleatorizado controlado con placebo, *The Lancet* 365, 1552-1560.
85. Ruffmann, R., Wendel A. (1991) GSH rescue by N-acetylcysteine, *Journal of Molecular Medicine* 69, 857-862.
86. Guerrero, C. A., Guerrero R. Rafael and Acosta Orlando. (2013) N-acetyl-cysteine: an efficient and safe treatment for rotavirus-associated diarrhoea in children, *Journal of Clinical Virology*.
87. Hong, C., Peter Tontonoz. (2008) Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors, *Curr Opin Genet Dev.* 18, 461-467.
88. Abdelrahman, M., Ahila Sivarajah, Christoph Thiemermann. (2005) Beneficial effects of PPAR-g ligands in ischemia–reperfusion injury, inflammation and shock, *Cardiovascular Research* 65, 772– 781.
89. Instituto Nacional Salud. (2010) Animales de Laboratorio, Bogotá.
90. (1989) Estatuto Nacional de Protección de los Animales In *Ley 84*, Republica de Colombia.
91. Manejo de animales de investigación, In *Ley 10 de 1990, Decreto 2164 de 1992 y Resolución 008430 de 1993*, Republica de Colombia.
92. Lugo-Martínez, V., Petit CS, Fouquet S, Le Beyec J, Chambaz J, Pinçon-Raymond M, Cardot P, Thenet S (2009) Epidermal growth factor receptor is involved in enterocyte anoikis through the dismantling of E-cadherin-mediated junctions, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G235-G244
93. Ricote, M., Glass CK. (2007) PPARs and molecular mechanisms of transrepression, *Biochim Biophys Acta* 1771, 926–935.
94. KyeongJin, K., Kook Hwan Kim, Eunsin Ha, Jin Young Park, Naoya Sakamoto, JaeHun Cheong. (2009) Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma, *FEBS Letters* 583, 2720-2726.
95. Raghava, P., Servio H. Ramirez, Bryan Knipe, Jessica Leibhart, Kathy Schall, David Heilman, Brenda Morsey, Aaron Mercer, Anil Papugani, Huanyu Dou and Yuri Persidsky. (2008)

- PPAR $\gamma$  activation suppresses HIV-1 replication in an animal model of encephalitis, *AIDS* 22, 1539-1549.
96. Ralf Arnold, M. N. a. W. K. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-c agonists inhibit respiratory syncytial virus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in human lung epithelial cells, *Immunology* 121, 71-81.
  97. Graff, J. W., Ettayebi Khalil and Hardy Michele E. (2009) Rotavirus NSP1 Inhibits NF $\kappa$ B Activation by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of  $\beta$ -TrCP: A Novel Mechanism of IFN Antagonism, *PLoS Pathogens* 5.
  98. Janeway, C. J., Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition., *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
  99. Waris, G., Ahsan H. (2006) Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions, *Journal of Carcinogenesis* 5, 1-8.
  100. Gloire, G., Legrand-Poels S., Piette J. (2006) NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later, *Biochemical pharmacology* 72, 1493-1505.
  101. Fujisama, K., Nishikawa T., Kukidome D., Imoto K., Yamashiro T. (2009) TZDs reduce mitochondrial ROS production and enhance mitochondrial biogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, 43-48.
  102. Xiaochen, Y., Zhengang Z., Kaizheng G., Pei Z., Jianhua Q. and Naifeng L. (2011) Inhibition of reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinases pathway by pioglitazone attenuates advanced glycation end products-induced proliferation of vascular smooth muscle cells in rats, *Biol. Pharm. Bull.* 34, 618-623.

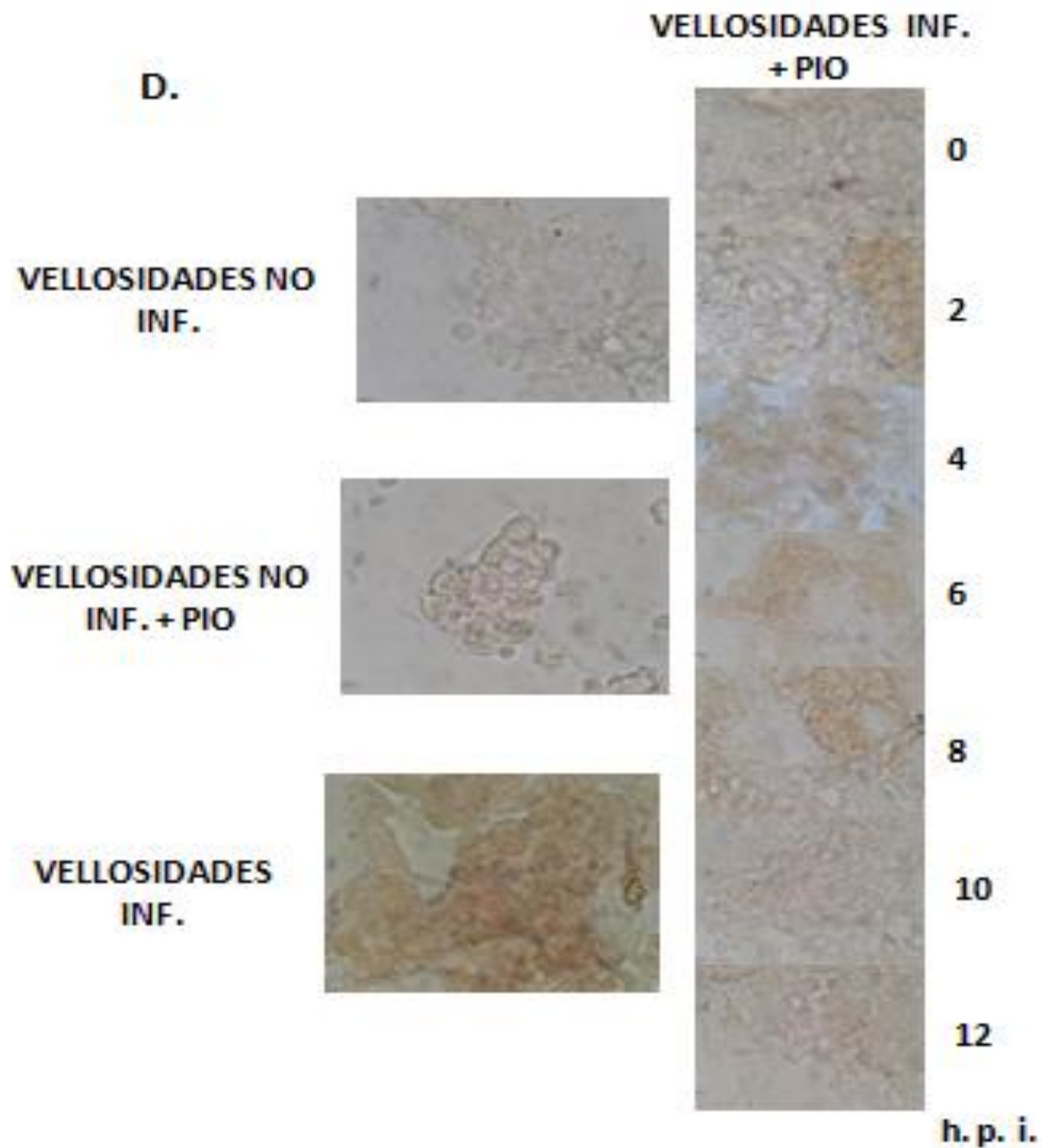
## ANEXO A.

Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo.



**ANEXO B.**

Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona *in vitro* (Modelo *in vitro*). Fotografías representativas de cada grupo.

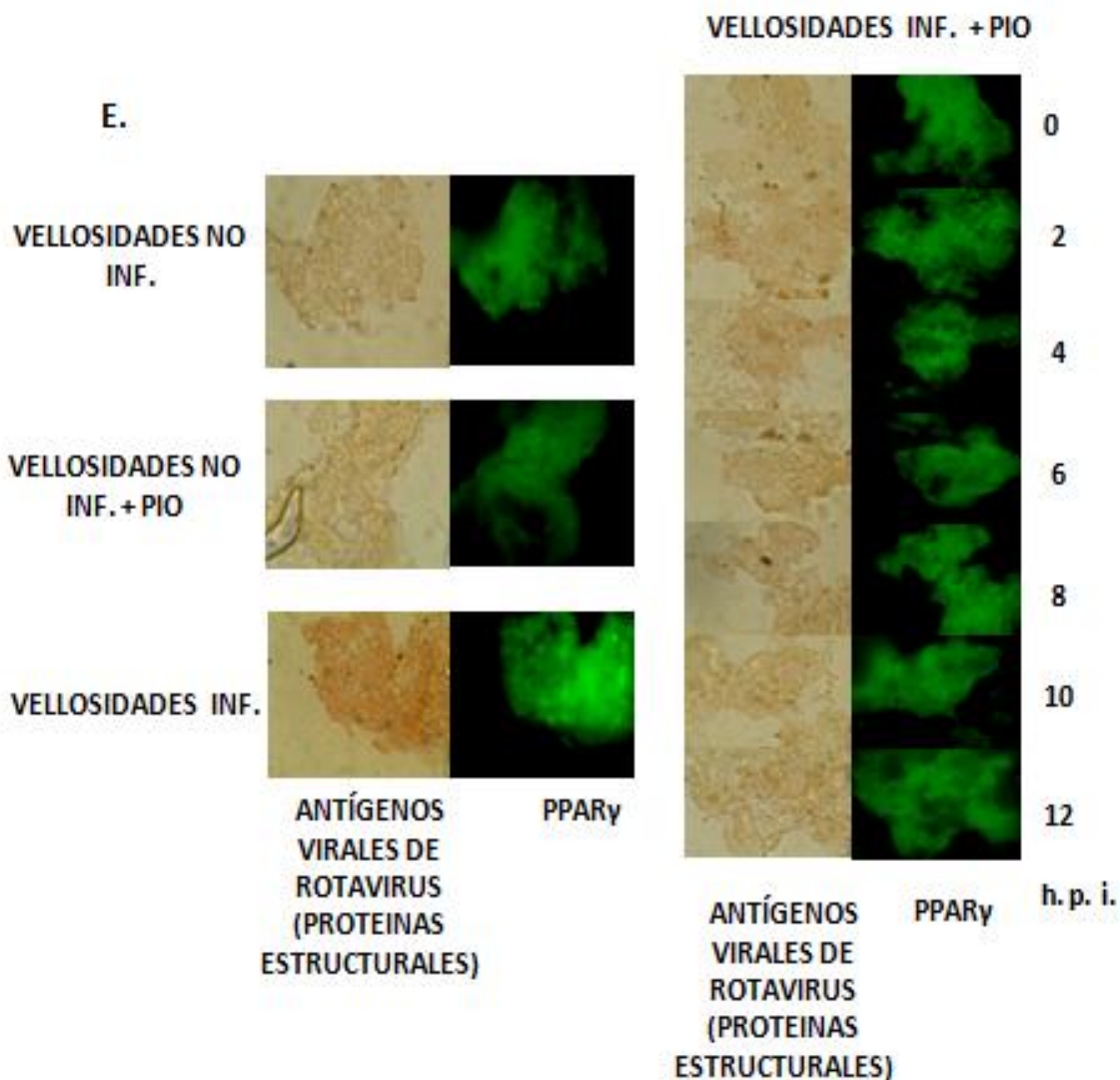






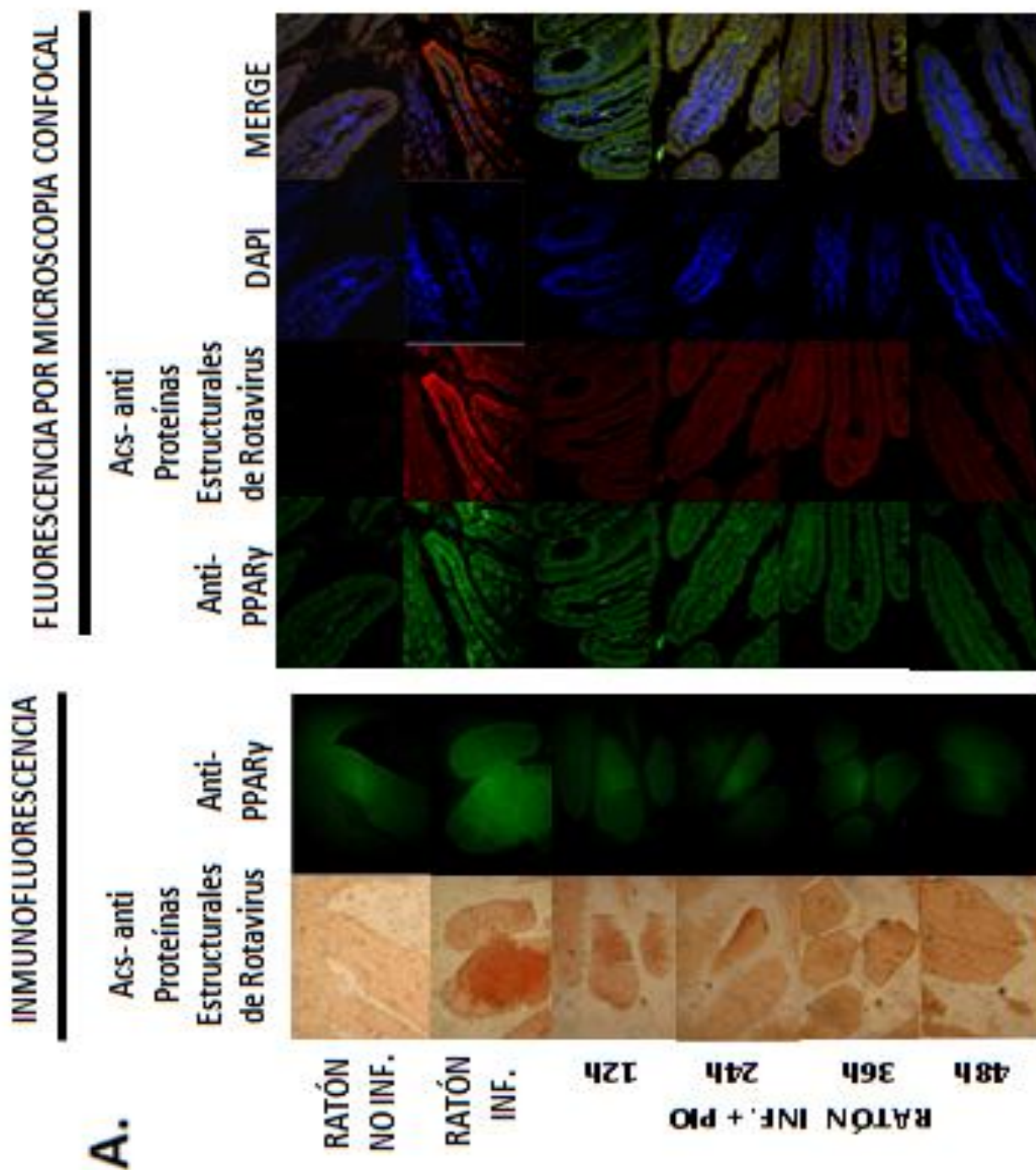
## ANEXO D.

Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de PPAR $\gamma$  en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona *in vitro* (Modelo *in vitro*). Fotografías representativas de cada grupo.



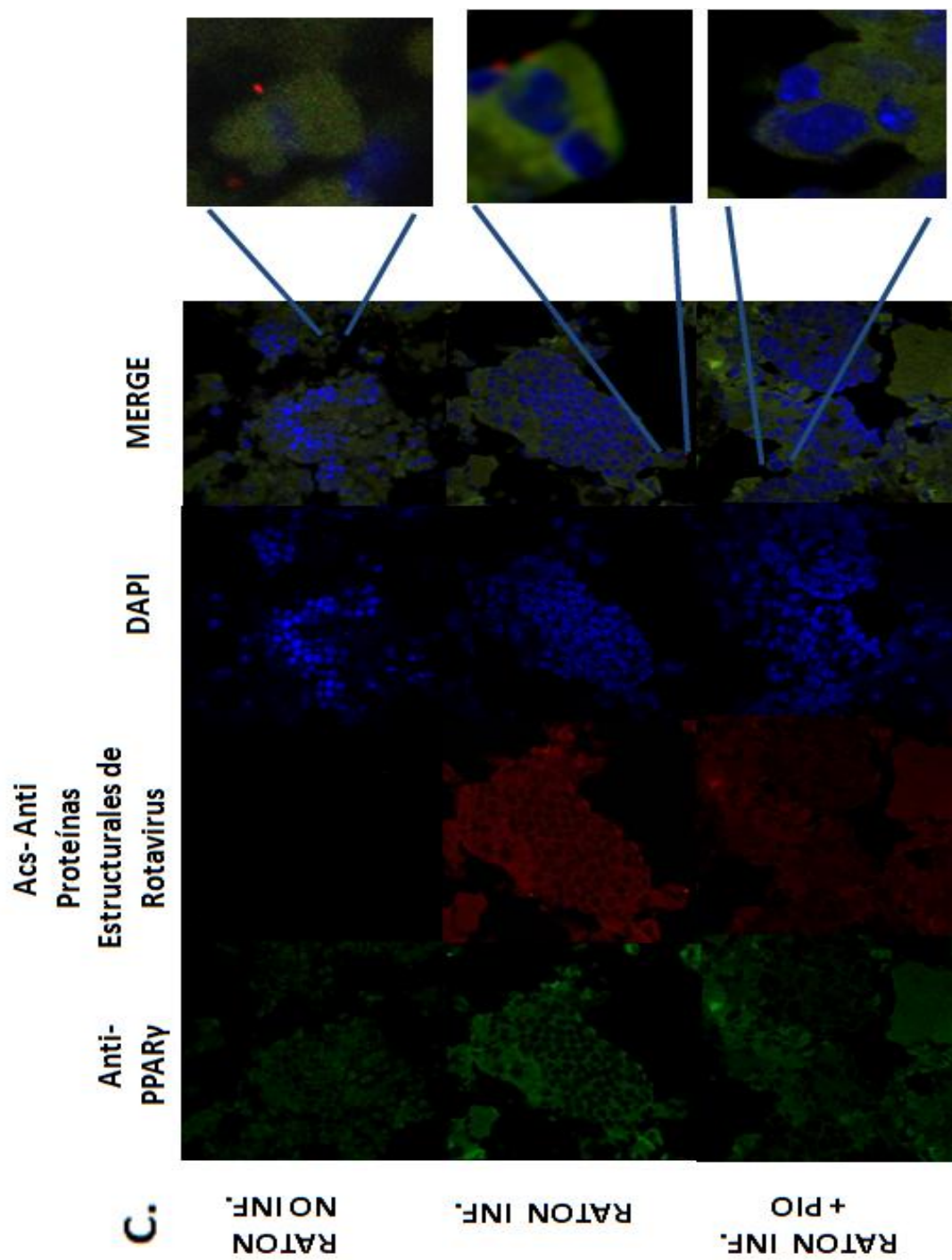
## ANEXO E.

Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular PPAR $\gamma$ .



## ANEXO F.

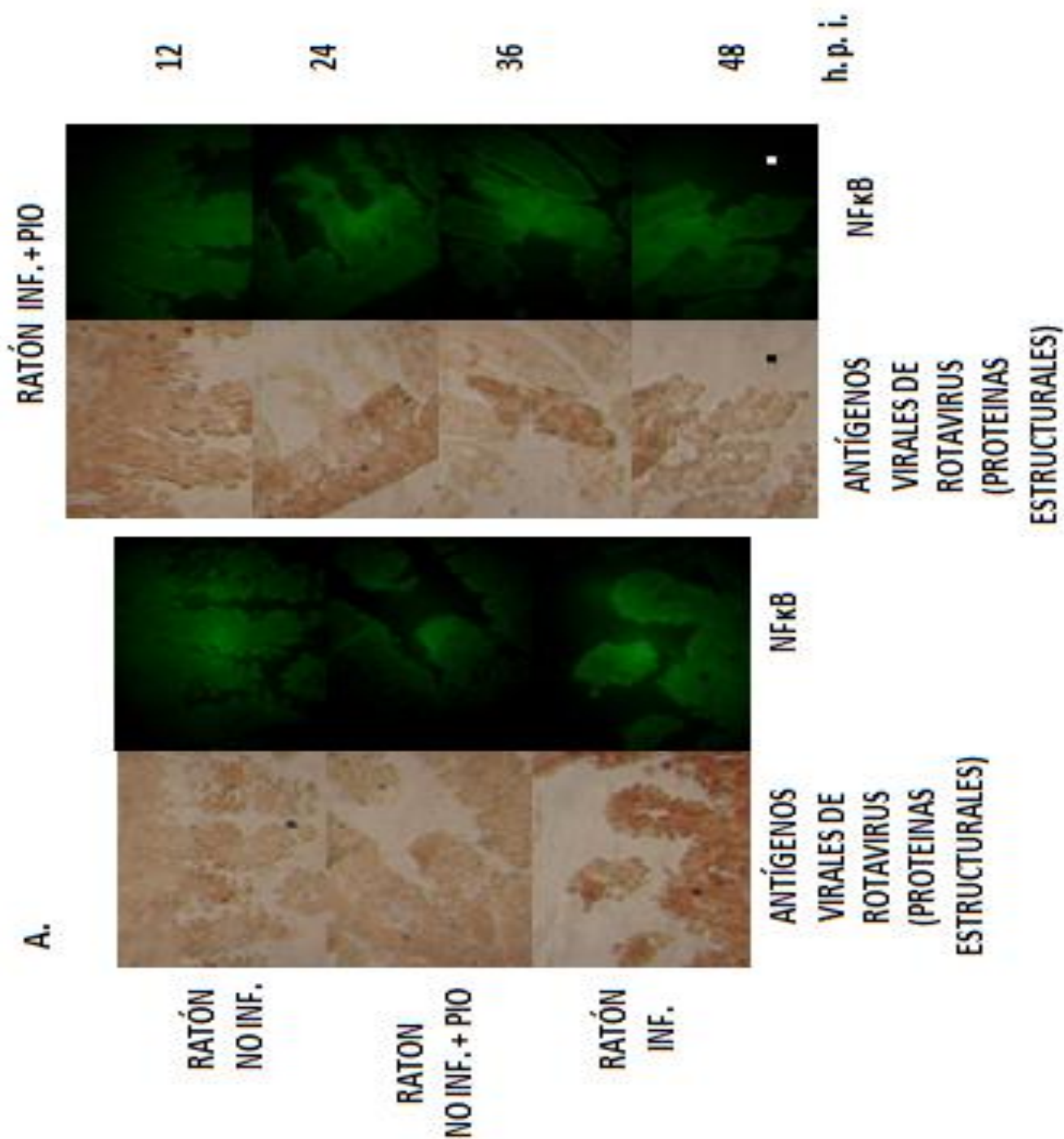
Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal de vellosidades aisladas para la detección y localización de PPAR $\gamma$ .





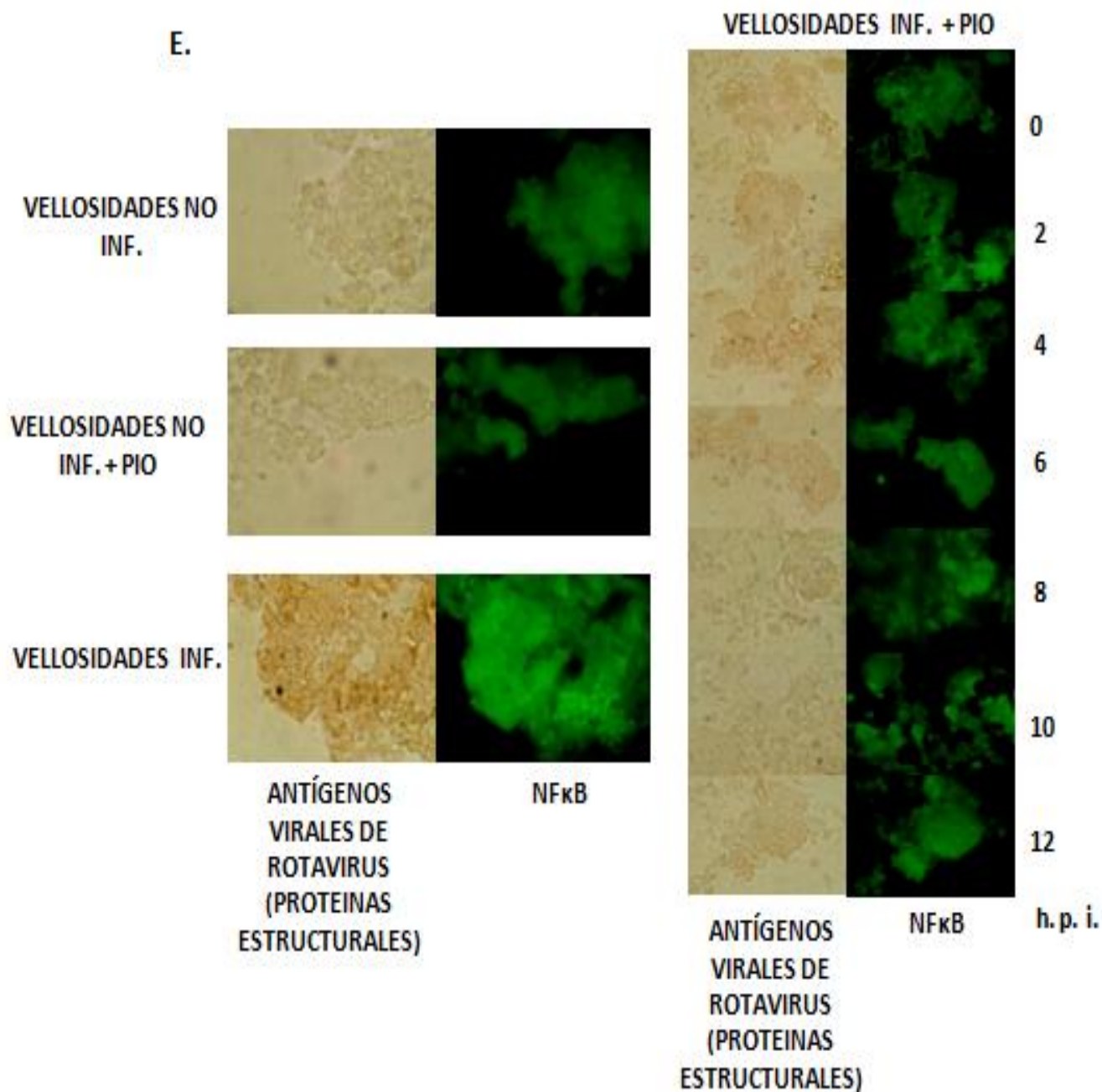
## ANEXO G.

Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de NFκB en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo.



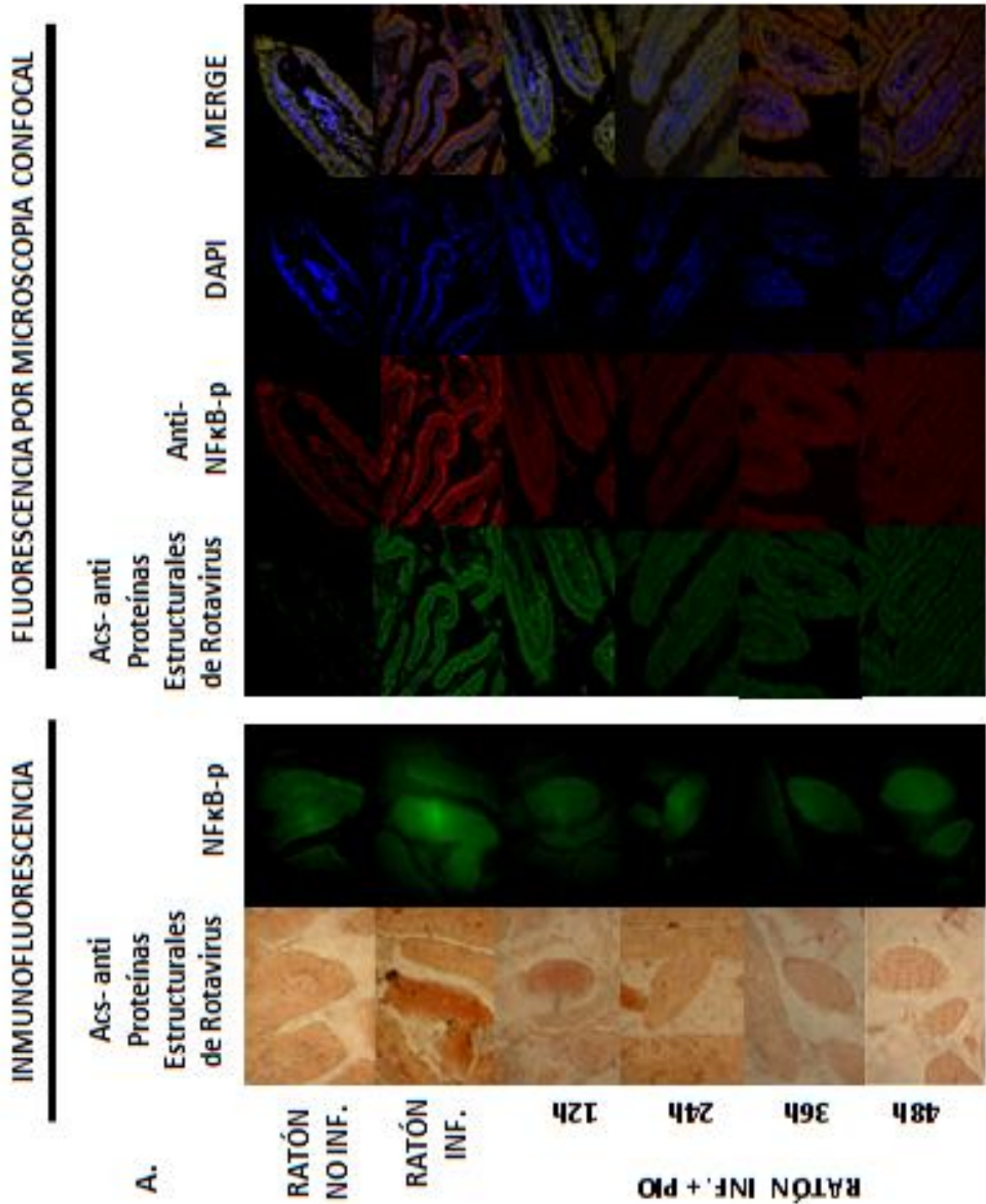
## ANEXO H.

Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de NFκB en vellosidades aisladas de ratones no infectados e infectados, tratados o no con pioglitazona *in vitro* (Modelo *in vitro*). Fotografías representativas de cada grupo.



ANEXO I.

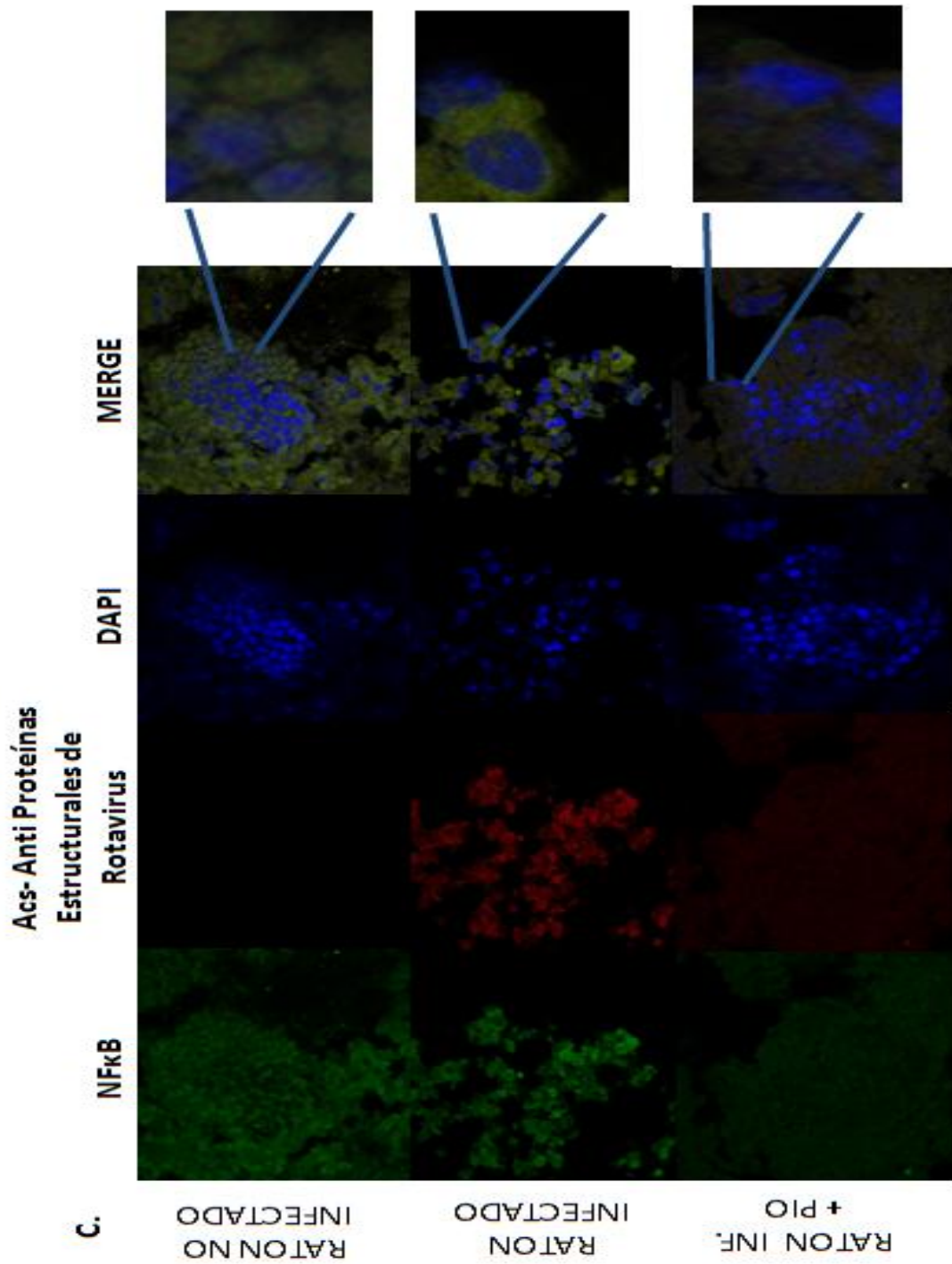
Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular NFκB-p.





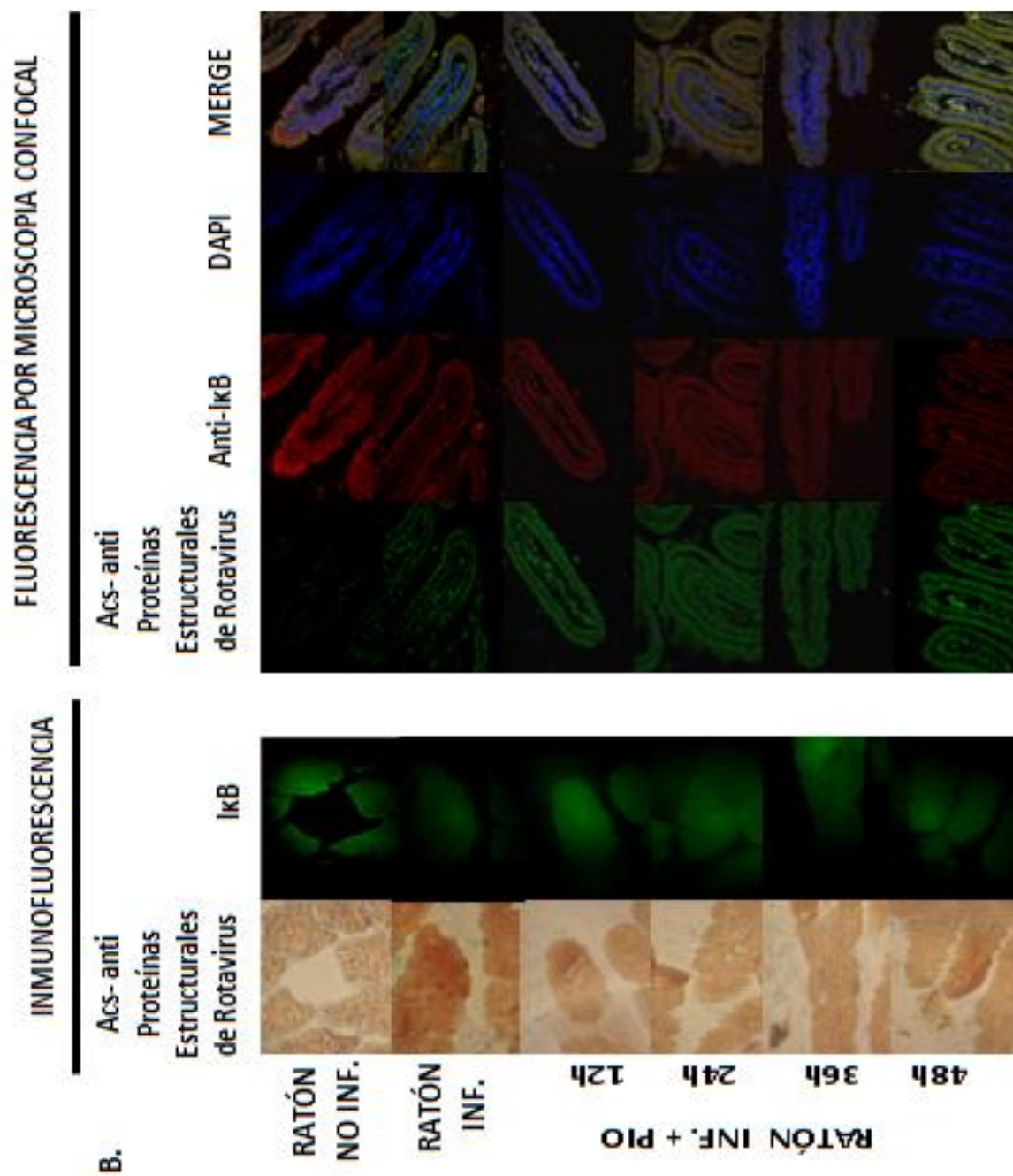
## ANEXO J.

Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal de vellosidades aisladas para la detección y localización de NFκB.



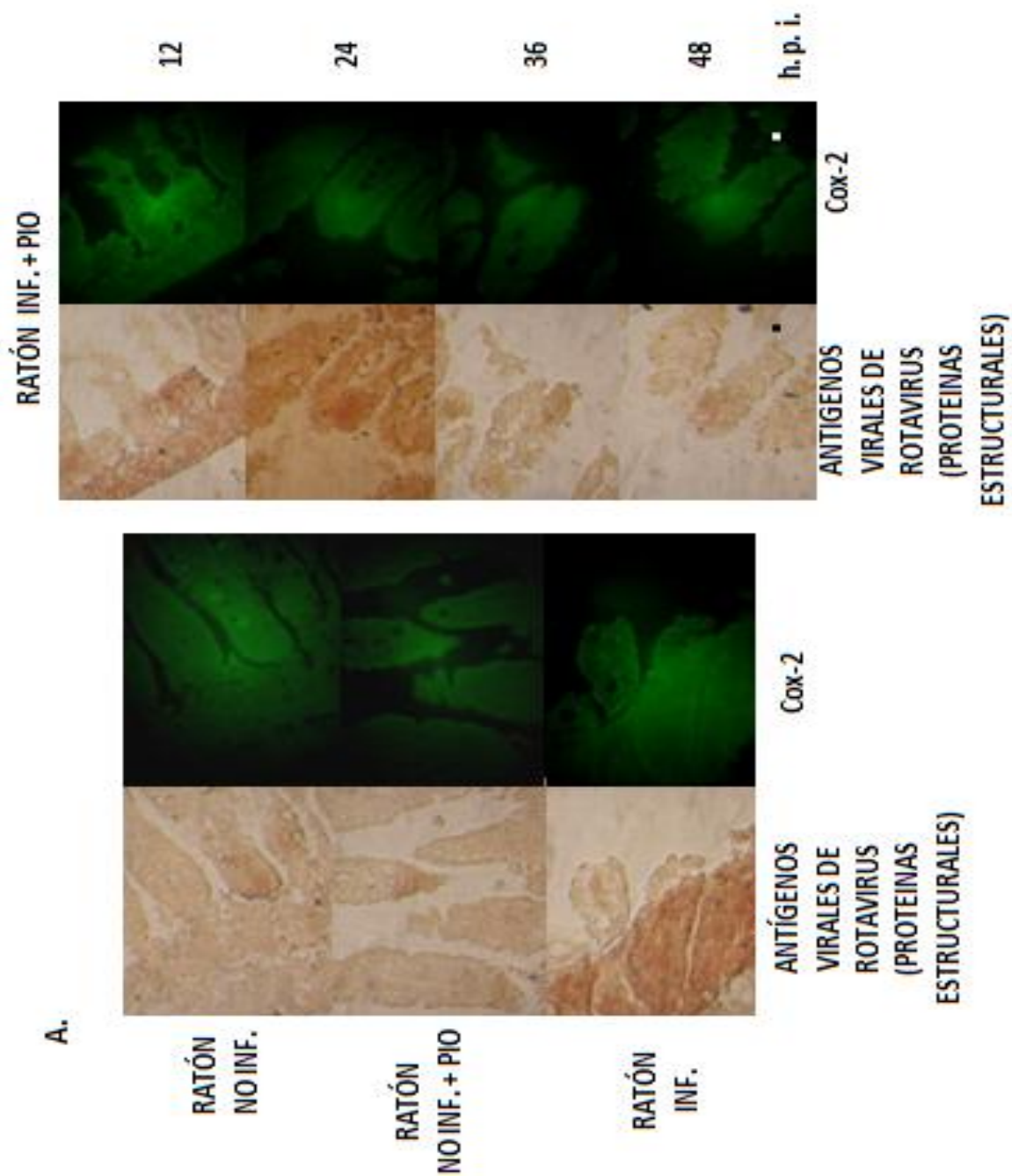
## ANEXO K.

Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular IκB.



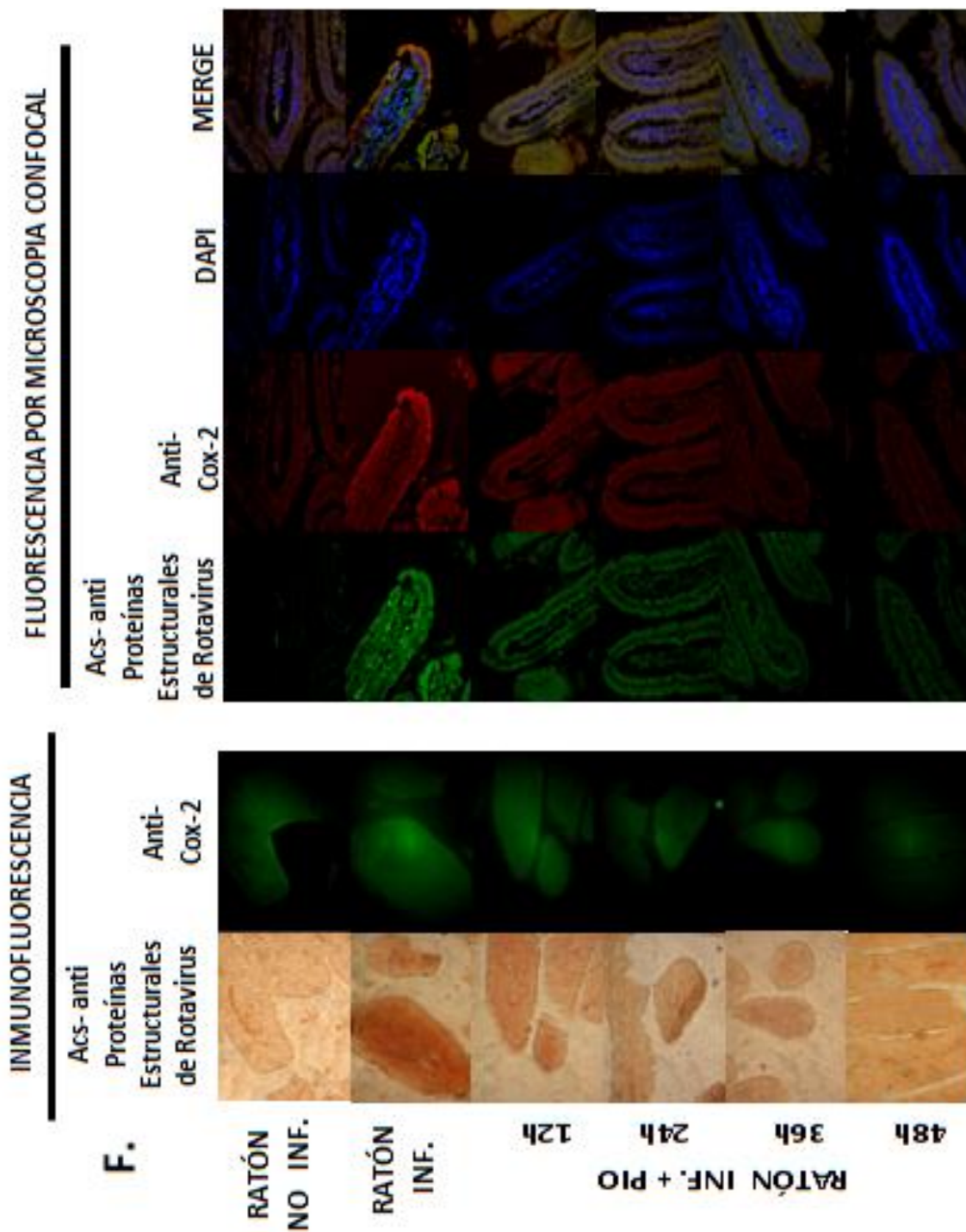
**ANEXO L.**

Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de Cox-2 en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo.



ANEXO M.

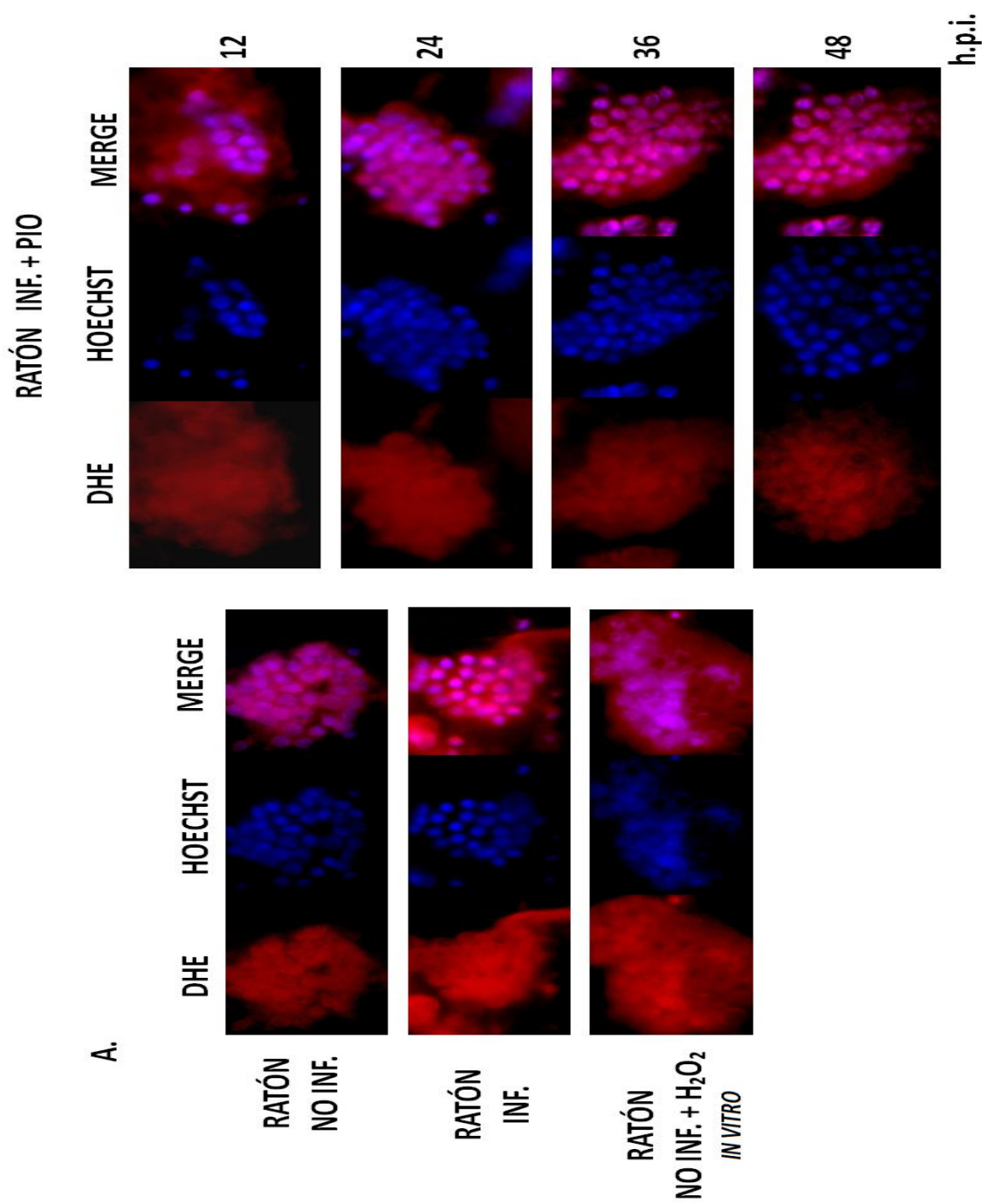
Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopia confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular Cox-2.





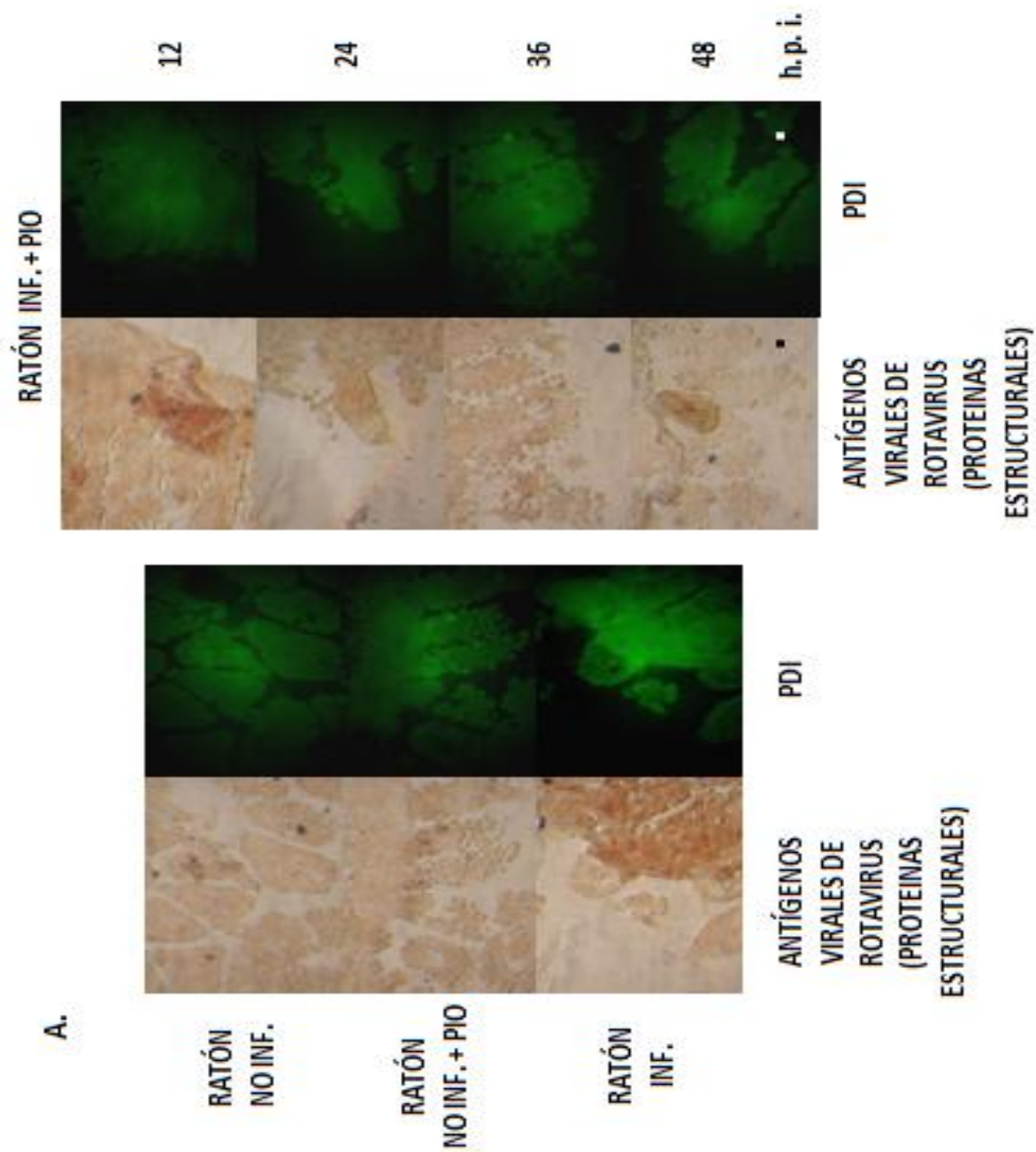
## ANEXO N.

Fotografías representativas de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS u EROs) en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona; modelo *in vivo*, utilizando el kit Cellomics® Oxidative Stress I.



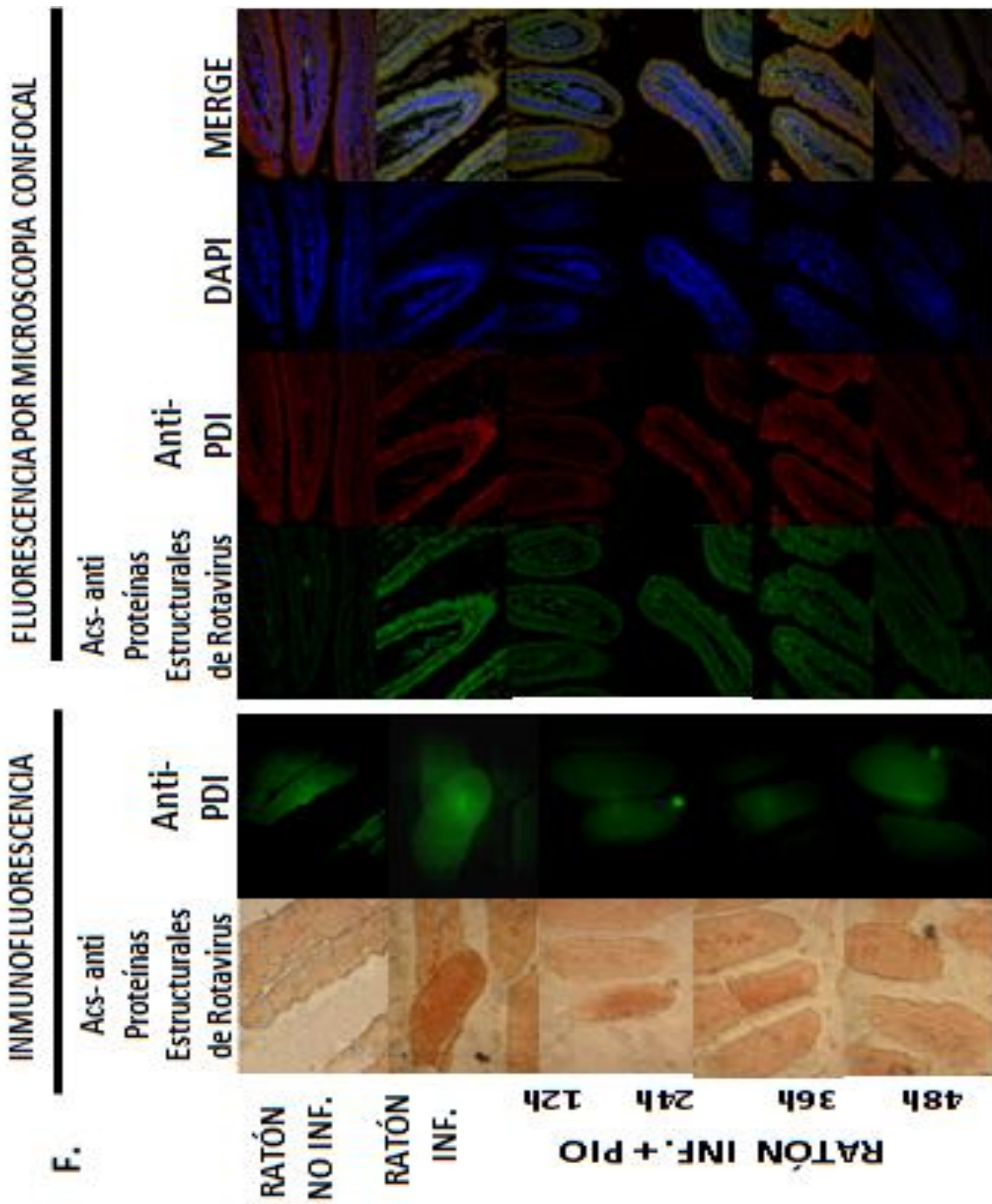
## ANEXO O.

Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de PDI en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo.



ANEXO P.

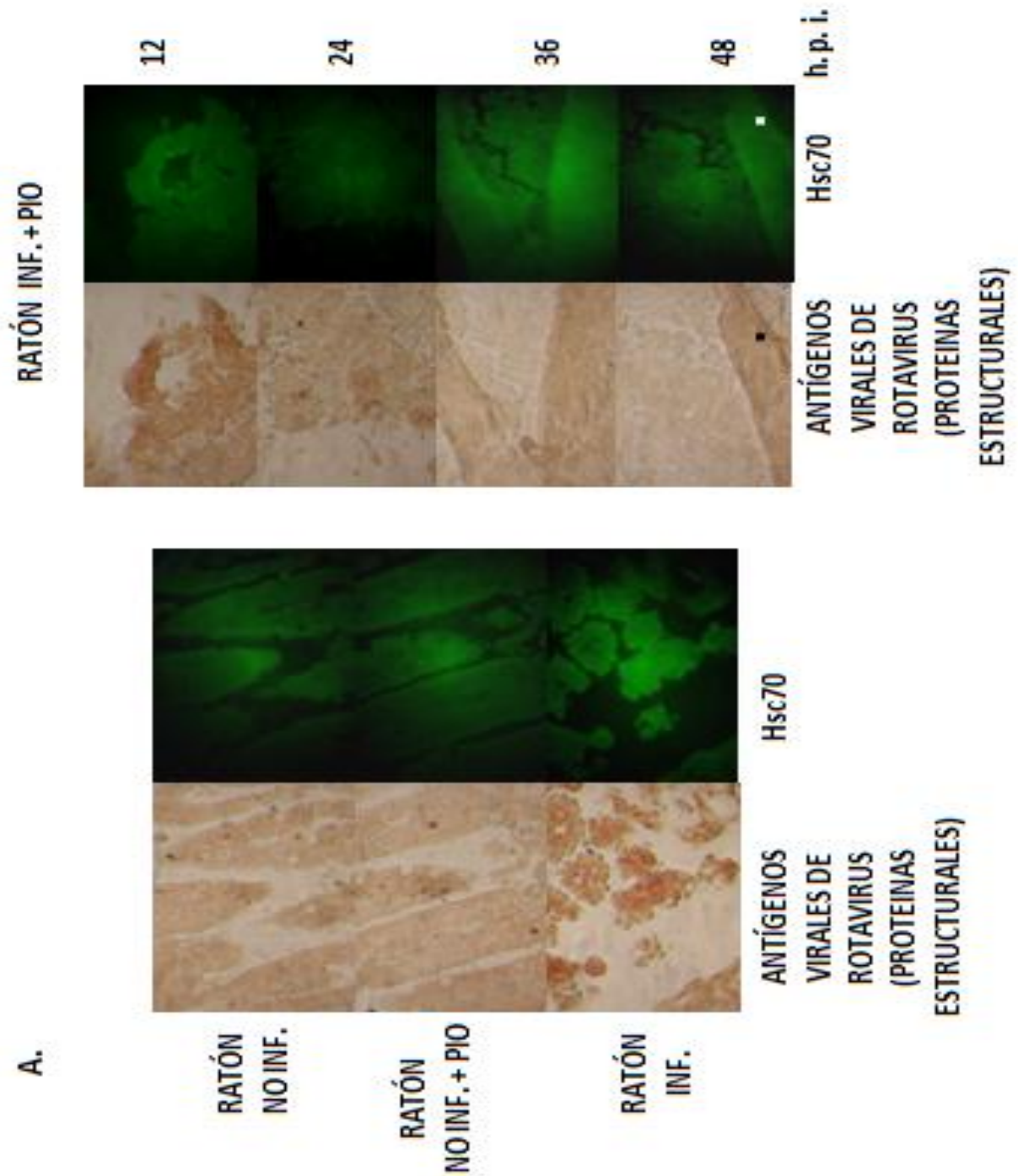
Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular PDI.





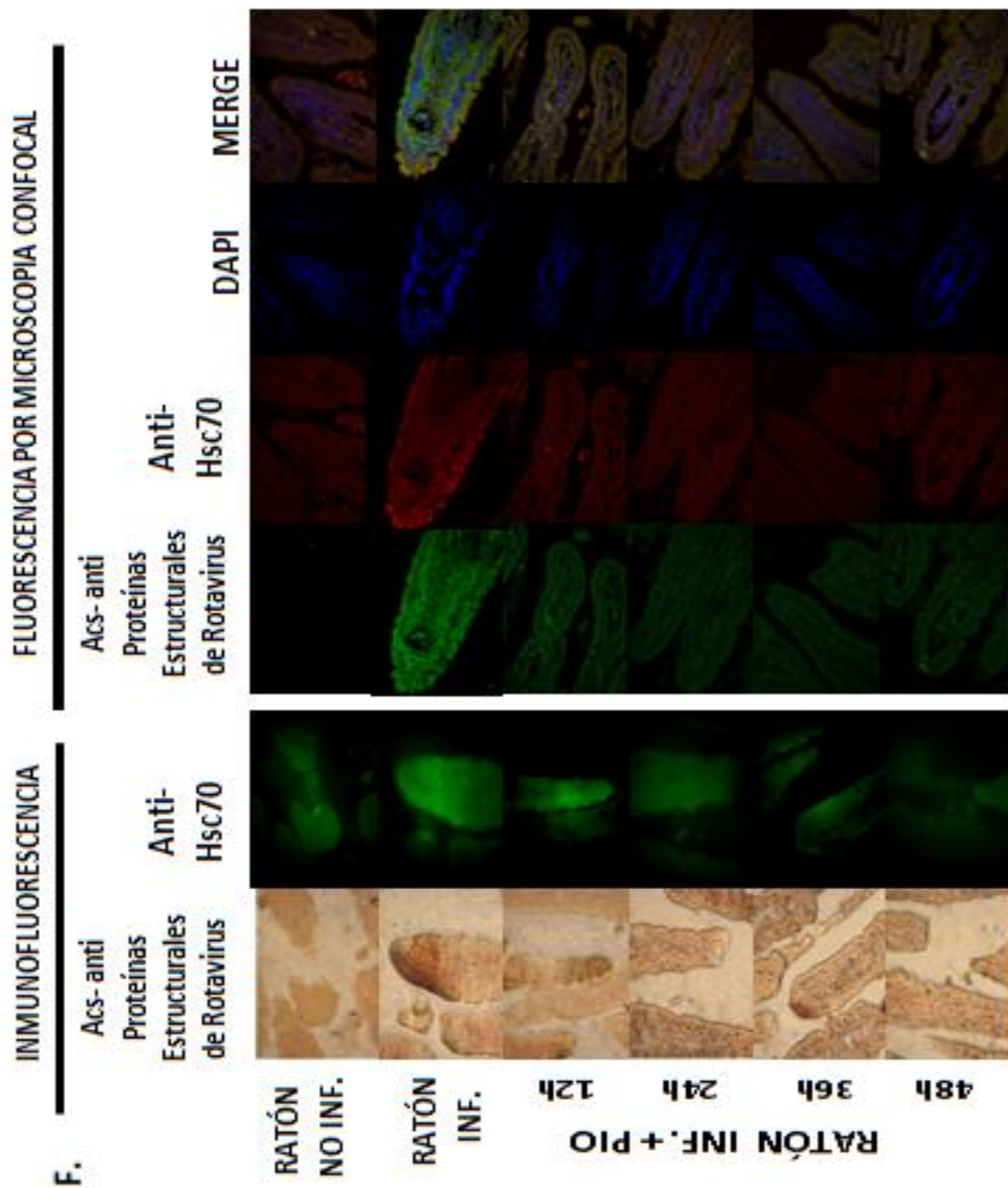
ANEXO Q.

Inmunocitoquímica de la expresión de antígenos de rotavirus e inmunofluorescencia de la expresión de Hsc70 en vellosidades extraídas de ratones no infectados, infectados e infectados y tratados con pioglitazona (Modelo *in vivo*). Fotografías representativas de cada grupo



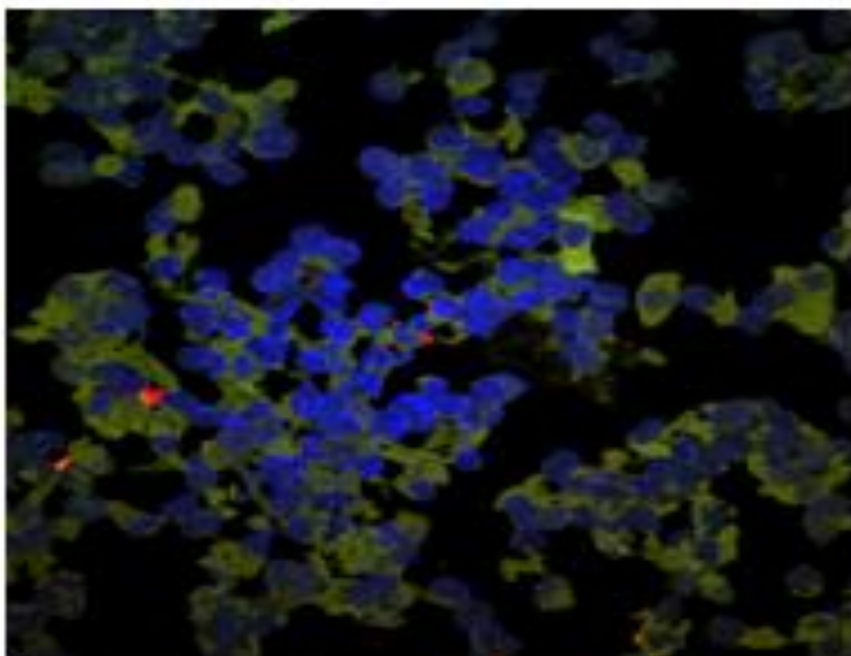
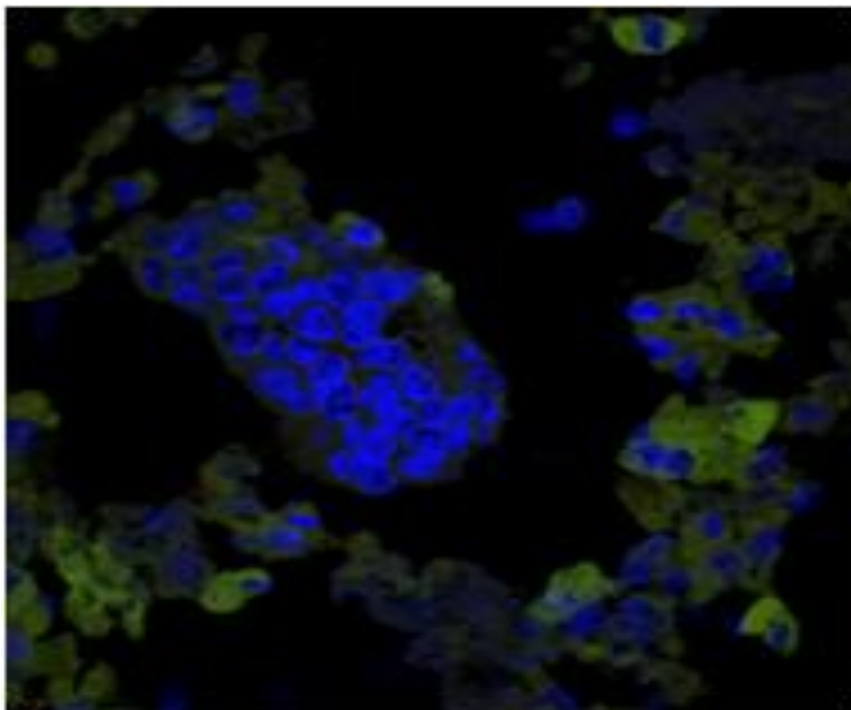
## ANEXO R.

Fotografías representativas del análisis de la fluorescencia por microscopía confocal e inmunofluorescencia de cortes histológicos duodenales, detección de la expresión de antígenos de rotavirus y de la proteína celular Hsc70.



**ANEXO S.**

Fotografías representativas de las vellosidades extraídas con disgregación parcial. (Tomadas por microscopia confocal).



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DE GRADO – MAESTRÍA**

**1. IDENTIFICACIÓN**

Maestría: **BIOQUÍMICA**

Estudiante: **DORY LINETH GOMEZ MORENO** C.C: 53.098.853

Director de Tesis: Carlos A Guerrero F MD, MSc, Ph.D.

Título del Trabajo: **“Evaluación de la expresión de las proteínas PPAR $\gamma$  y NF $\kappa$ B en vellosidades intestinales de ratones adultos ICR infectados con rotavirus ECwt y tratados con pioglitazona”.**

**2. SUSTENTACIÓN**

Fecha: 2 de Julio de 2013

Lugar: Salón 407

**3. EVALUACIÓN**

Después de analizar el trabajo escrito y participar en la sesión de sustentación, en nuestra calidad de Jurado Calificador, hemos decidido otorgar el trabajo objeto de evaluación. La calificación :

APROBADO



REPROBADO



**4. MENCIÓN**

Por razones que justificaremos por escrito en documento que presentaremos al Consejo de la Facultad en un lapso no superior a los 15 días, contados a partir de la fecha de la presente Acta, hemos decidido por unanimidad solicitar para el trabajo la siguiente mención:

MERITORIA




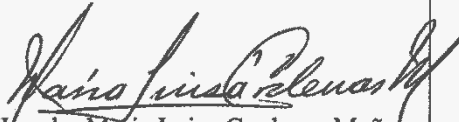
LAUREADA




5. Justificación, observaciones y constancias si el trabajo es reprobado

En constancia de todo lo anterior firmamos en calidad de miembros del Jurado Calificador

  
 Jurado: Oscar armando García Vega  
 Universidad Nacional de Colombia  
 C.C: 79371566

  
 Jurado: María Luisa Cardenas Muñoz  
 Universidad Nacional de Colombia  
 C.C: 39702734 1379

  
 Luis Fernando Ospina Giraldo  
 Universidad Nacional de Colombia  
 C.C: 79.259.674

Acta del Consejo de Facultad No. 16 del 16 de Mayo de 2013 en el que se nombran los miembros del Jurado Calificador.

FECHAS DE RECEPCIÓN EN LA SECRETARIA DE LA FACULTAD

1. Acta de Sustentación debidamente diligenciada:
2. Justificación de la solicitud de mención: