



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EVALUACION DE LA INFECTIVIDAD DE ROTAVIRUS
(ECwt) EN VELLOSIDADES INTESTINALES DE RATONES
ADULTOS ICR, TRATADOS CON INHIBIDORES DE NF-kB.**

WILDER LISANDRO CELY RODRIGUEZ

Universidad nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Maestría en ciencias Farmacéuticas

Bogotá d. C. Colombia

2019

**EVALUACION DE LA INFECTIVIDAD DE ROTAVIRUS
(ECwt) EN VELLOSIDADES INTESTINALES DE RATONES
ADULTOS ICR, TRATADOS CON INHIBIDORES DE NF-KB.**

WILDER LISANDRO CELY RODRIGUEZ

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias farmacéuticas.**

Director:

MD. MSc. PhD. CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA

Grupo de Investigación:

Biología Molecular de virus

Universidad nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Maestría en ciencias Farmacéuticas

Bogotá d. C. Colombia

2019

Dedicatoria

Desde lo más profundo de mí ser, dedico el esfuerzo de este trabajo como una forma de reconocimiento y agradecimiento a mis padres. Héctor y Ana por ser el apoyo y motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis PADRES: que me brindaron desde toda índole, el fortalecimiento para generar mi desarrollo como ser, esto es para y por ustedes.

A mis hermanos Elver, Carmenza y Ferney que son la guía y alegría de mi vida.

A la Universidad Nacional de Colombia, en especial al departamento de Farmacia y profesores que me forjo como profesional.

A mi director: Carlos Arturo Guerrero Fonseca por su amistad, orientación y colaboración en el desarrollo de este trabajo, sin usted esto no hubiera sido posible.

A cada compañero del grupo Biología Molecular del Virus Rafael, Carlos, José, Pedro, Natalia, Liliana y Erika por su amistad, colaboración y apoyo.

A cada uno de mis compañeros de semestre por su amistad y compañía.

A cada una de las personas que se cruzaron en mi vida de una y otra forma y compartieron un instante.

RESUMEN.

Los rotavirus causan gastroenteritis aguda con gran impacto en la morbilidad y mortalidad de la población infantil. La estrategia terapéutica a nivel mundial utilizada hasta el momento es la vacunación, pero no asegura que los síntomas desaparezcan completamente. Por tal razón, en el Laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional de Colombia se investiga sobre las interacciones del rotavirus y la célula huésped, evaluando con fármacos la modulación de moléculas celulares como ROS, NF-kB, PPAR γ y COX-2 entre otras, como promisorio mecanismo de mitigación de la infección. Por consiguiente, en este trabajo se evaluó la infección por rotavirus (ECwt) en vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR tratadas con inhibidores específicos de NF-kB como curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato, analizando la variación en la expresión de ésta y la infección por técnicas de ELISA, inmunofluorescencia y Western Blotting. Se encontró que la expresión de la proteína NF-kB medida en intensidad media de fluorescencia y los antígenos virales, incrementaban con la infección, pero al tratar con los inhibidores la expresión de la proteína disminuye al igual que los porcentajes de absorbancia del antígeno viral. Las vellosidades aisladas de ratón ICR al ser inoculadas *in vitro* con el rotavirus ECwt, incrementan la expresión de la proteína NF-kB y de proteínas relacionadas en las vías pro-inflamatorias, tales como PPAR γ y COX-2 además de los niveles de ROS. Por otro lado, el uso de inhibidores de NF-kB tales como curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato disminuyen la expresión de estas proteínas, como también los niveles de ROS y reduce la producción de antígenos virales.

Palabras clave: Rotavirus ECwt; NF-kB; inhibidores; ratones adultos ICR; vellosidades intestinales.

ABSTRACT

Rotaviruses cause acute gastroenteritis with great impact on the morbidity and mortality of children. The worldwide therapeutic strategy used so far is vaccination, but it does not ensure that the symptoms disappear completely. For such a motive in the Laboratory of Molecular Biology of Virus of the National University of Colombia is investigating between interactions of the rotavirus and the host cell, evaluating the modulation of cellular molecules with reagents such as ROS, NF-kB, PPAR γ and COX-2 among others, as a promising mechanism to mitigate the infection. Therefore, the aim of this work was evaluate rotavirus (ECwt) infection on in vitro model system consisting of intestinal villi isolated from ICR adult mice, infected with ECwt and treated with specific NF-kB inhibitors such as curcumin, Diethyldithiocarbamate and diethyl maleate, analyzing the variation in NF-kB expression and rotavirus infection by ELISA, immunofluorescence and Western Blotting techniques. We found that NF-kB protein expression measured in mean fluorescence intensity and viral antigens to increase with infection, but when intestinal villi isolated - infected with rotavirus were treated with inhibitors, the protein expression decreases as did the percentages of viral antigen absorbance. The isolated villi of mouse ICR when inoculated in vitro with the ECwt rotavirus, increase the expression of NF-kB protein and related proteins in pro-inflammatory pathways, such as PPAR γ and COX-2 in addition increase to ROS levels. In addition, the use of NF-kB inhibitors such as curcumin, diethyl-carbamate and diethyl-maleate decrease the expression of these proteins, as well as ROS levels and reduce viral antigen production. On the other hand, the use of NF-kB inhibitors such as curcumin, diethyl carbamate and diethyl maleate decrease the expression of these proteins, as well as ROS levels and reduce the production of viral antigens.

Keywords: Rotavirus ECwt; NF-KB; inhibitors; adult ICR mice; intestinal villi.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABLAS	12
.....	14
ABREVIATURAS	14
1 INTRODUCCION.	16
2 ANTECEDENTES.	18
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	19
4 JUSTIFICACIÓN.	20
5 OBJETIVOS.....	22
5.1 OBJETIVO GENERAL.	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
6 MARCO TEÓRICO.....	23
6.1 GENERALIDADES DE LOS ROTAVIRUS.....	23
6.2 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS.....	24
6.3 CARACTERÍSTICAS DEL CICLO INFECCIOSO DE ROTAVIRUS.....	25
6.4 MOLÉCULAS CELULARES INVOLUCRADAS EN LA PATOGÉNESIS DEL ROTAVIRUS. 27	
6.4.1 <i>Proteína disulfuro isomerasa (PDI)</i>	28
6.4.2 <i>Proteína de choque térmico de 70KDa (HSP70) y proteína de choque térmico constitutiva, 70KDa (HSC70)</i>	29
6.4.3 <i>Ciclooxigenasa-2 (COX-2)</i>	29

6.4.4	<i>Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPARγ)</i>	30
6.4.5	<i>Factor nuclear kappa B (NF-kB)</i>	31
6.4.6	<i>Familia NF-kB</i>	32
6.4.7	<i>Proteínas IκBs</i>	33
6.5	ACTIVACIÓN DE NF-kB	33
6.5.1	<i>Ruta clásica o canónica</i>	34
6.5.2	<i>Ruta alternativa o no canónica</i>	34
6.6	NF-kB Y VIRUS	35
6.7	ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROS O ROS)	37
6.8	INHIBIDORES DE NF-kB	38
6.8.1	<i>Curcumina (CUR)</i>	38
6.8.2	<i>Dietilditiocarbamato (DC)</i>	39
6.8.3	<i>Dietil-maleato (maleato de dietilo) (DM)</i>	39
7	MATERIALES Y MÉTODOS	41
7.1	ANIMALES	41
7.2	VIRUS	41
7.3	REACTIVOS	41
7.4	AISLAMIENTO DE VELLOSIDADES INTESTINALES	42
7.5	TRATAMIENTO CON INHIBIDORES DE NF-kB SOBRE LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS EN LAS VELLOSIDADES INTESTINALES DE RATONES ADULTOS ICR INFECTADAS CON ROTAVIRUS ECWT	43
7.6	INMUNOCITOQUÍMICA DE VELLOSIDADES AISLADAS	43
7.7	INMUNOFLUORESCENCIA	44

7.8	ELISA DE CAPTURA.	44
7.9	DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.	45
7.10	WESTERN BLOT.....	45
7.11	REINFECCIÓN.....	46
7.12	VIABILIDAD CON AZUL DE TRIPÁN.	46
7.13	ANÁLISIS DE DATOS.	47
7.14	SUJETOS DE ESTUDIO, TAMAÑO DE LA MUESTRA Y RECLUTAMIENTO.	47
8	RESULTADOS.....	48
8.1	LOS INHIBIDORES DE NF-KB REDUCEN LA INFECCIÓN DE ROTAVIRUS EN VELLOSIDADES AISLADAS DE RATÓN ADULTO ICR.....	48
8.2	INHIBIR LA VÍA NF-KB REDUCE LA PRODUCCIÓN DE VIRIONES (TLPs) EN VELLOSIDADES AISLADAS DE RATÓN ICR.	51
8.3	LA INFECCIÓN DE VELLOSIDADES INTESTINALES DE RATONES ADULTOS ICR CON ROTAVIRUS ECWT MODIFICA LA EXPRESIÓN DE NF-KB.	56
8.4	APLICANDO INHIBIDORES DE NF-KB, ANTES O DESPUÉS DE LA INFECCIÓN, SE DISMINUYE LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES.	59
8.4.1	<i>Los inhibidores específicos de NF-kB en vellosidades intestinales de ratón ICR alteran la expresión de la proteína PPARγ.</i>	65
8.4.2	<i>Los inhibidores específicos de NF-kB en vellosidades intestinales de ratón ICR alteran la expresión de la proteína COX-2.</i>	69
8.5	LOS INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE NF-KB EN VELLOSIDADES INTESTINALES DE RATÓN ICR ALTERAN LA EXPRESIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.	73
9	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	76
10	CONCLUSIONES.	81

11	RECOMENDACIONES.....	81
12	BIBLIOGRAFIA.....	82
13	ANEXOS.....	93
13.1	ANEXO A.....	93
13.2	ANEXO B.....	94
13.3	ANEXO C.....	95
13.4	ANEXO D.....	96
13.5	ANEXO E.....	97
13.6	ANEXO F.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la partícula viral con sus proteínas estructurales y no estructurales en las tres capas.....	23
Figura 2. Etapas de infección por Rotavirus.....	27
Figura 3. Miembros de la familia NF-κB.....	33
Figura 4. Vía Canónica y No Canónica para la activación de NF-κB	35
Figura 5. Diferentes mecanismos de la activación de NF-κB por virus.....	36
Figura 6. Absorbancia de infección en las vellosidades infectadas tratadas con inhibidores específicos de NF-kB.....	48
Figura 7. Viabilidad de vellosidades aisladas determinada por el método de exclusión con Azul Tripan.....	50
Figura 8. Porcentaje de Infección en las vellosidades infectadas tratadas con Inhibidores de NF-kB.....	52
Figura 9. NF-kB modifica su expresión en vellosidades intestinales de ratones adultos ICR infectadas con rotavirus ECwt y tratadas con inhibidores	57
Figura 10. Los inhibidores de NF-kB afectan de manera similar cuando se adicionan antes y después de infectar con rotavirus.....	62
Figura 11. PPARγ modifica su expresión al tratar con inhibidores de NF-kB las vellosidades de ratón ICR infectadas con rotavirus.	66
Figura 12. La proteína COX-2 modifica su expresión al tratar con inhibidores de NF-kB las vellosidades de ratón ICR infectadas con rotavirus.	70
Figura 13. La expresión de las especies reactivas de oxígeno (ERO o “ROS”) cambian al tratar con inhibidores de NF-kB en Vellosidades infectadas con rotavirus	74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento estadístico para las concentraciones utilizadas para los tres inhibidores de NF-kB.....	50
Tabla 2. Tratamiento estadístico de la Viabilidad de vellosidades aisladas determinada por el método de exclusión con Azul Tripan	51
Tabla 3. Tratamiento estadístico (ELISA) para determinar la producción de antígenos virales de rotavirus en vellosidades infectadas y tratadas con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato	54
Tabla 4. Tratamiento estadístico del porcentaje para ELISA de antígenos virales en re-infección	55
Tabla 5. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para pNF-kB	59
Tabla 6. Tratamiento estadístico (ELISA) para determinar la producción de antígenos virales de rotavirus en vellosidades infectadas y tratadas con curcumina AI y DI	61
Tabla 7. Tratamiento estadístico (ELISA) para determinar la producción de antígenos virales de rotavirus en vellosidades infectadas y tratadas con dietil-carbamato AI y DI.	61
Tabla 8. Tratamiento estadístico (ELISA) para determinar la producción de antígenos virales de rotavirus en vellosidades infectadas y tratadas con dietil-maleato AI y DI.....	62
Tabla 9. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para pNF-kB AI y DI.	64

Tabla 10. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para PPARγ.	68
Tabla 11. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para COX-2.	72
Tabla 12. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para ROS	75

ABREVIATURAS

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

AP1: factor de transcripción AP1

ARN: Ácido ribonucleico.

C.I: células infectadas

C.S.I: células sin infectar

COX-2: ciclooxigenasa 2

dsRNA: RNA de doble cadena

DLP: partícula viral de doble capa

DTNB: Bacitracin o Reactivo de Ellman 5',5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)

DTT: Ditioneitol

ECwt: rotavirus silvestre murino (wild-type murine rotavirus) EDIM-Cambridge

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato

h.p.i.: horas post infección

h.p.t.: horas post tratamiento

HRP: peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)

Hsc70: proteína de choque térmico 70

ICR: Institute of Cancer Research

mARN: ácido ribonucleico mensajero

INS: instituto nacional de salud

iNOS: enzima óxido nítrico sintetasa

IKK α : kinasa alfa

MEM: medio minimo esencial Eagle modificado

MOI: Multiplicidad de infección.

NAC: N-acetilcisteína

NF-kB: factor nuclear kappa B

NPS: proteína no estructural

OPD: O-fenilendiamina dihidrocloruro.

PPAR γ : receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales

PDI: proteína disulfuro isomerasa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PBS: tampón fosfato salino

PIO: Pioglitazona

PVDF: Difluoruro de polivinilo.

ROS: especies reactivas de oxígeno

ROSI: Rosiglitazona

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio. **STAT:** Signal Transducers and Activators of Transcription

TAD: transcription activation domain

TNF: Factor de necrosis tumoral

TZDs: tiazolidinedionas

VP: proteína viral

1 INTRODUCCION.

La infección con rotavirus es la causa más común de diarrea severa en niños menores de cinco años, teniendo un gran impacto en la morbilidad y mortalidad de la población infantil; ocasionando 111 millones de episodios, alrededor 25 millones de consultas, 2 millones de hospitalizaciones y ~215.000 muertes anuales [1, 2], con mayor predominancia en países en vía de desarrollo [3].

La estrategia terapéutica utilizada hasta el momento para prevenir la incidencia de la diarrea deshidratante causada por la infección con rotavirus es la vacunación. Actualmente existen dos vacunas disponibles para prevenir esta patología, Rotarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) y RotaTeq™ (Merck & Co. Inc., West Point, PA, USA), las cuales disminuyen la intensidad de los síntomas pero no evitan que se presenten, ya que el porcentaje de eficiencia en la disminución de la infección después de la vacunación es ~65% y no es accesible a toda la población [4]. En países latinoamericanos un 35% de los niños presentan episodios de diarrea a pesar de haber recibido la vacuna, donde algunos casos con diarrea severa requirieron hospitalización, convirtiéndose en un problema social con elevados costos adicionales [5, 6]. Por tal motivo, es necesaria la creación de nuevas estrategias que contribuyan a disminuir la infección. A través de la comprensión de muchos aspectos biológicos, bioquímicos y moleculares del rotavirus, se permitirá el desarrollo de alternativas de prevención y el control de la infección viral.

En el laboratorio Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional, se han adelantado estudios que pretenden esclarecer sobre la biología del virus, investigando las interacciones entre el rotavirus y la célula huésped, las vías de señalización que se activan o inhiben y que favorecen la replicación e infección viral a fin de obtener alternativas en el tratamiento del proceso infeccioso. Dentro de los trabajos realizados en el laboratorio, se ha determinado que al modular la reacción de óxido-reducción (redox) en la célula, con fármacos como N-acetilcisteína (NAC), ácido ascórbico, Ditioneitol (DTT), Bacitracin o Reactivo de Ellman 5',5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), interfieren con la infección de rotavirus [5, 6]. Igualmente, al aplicar fármacos como AINES (antiinflamatorios no esteroideos) y agonistas de PPAR γ se reduce la infección *in vitro* en líneas celulares y en

vellosidades aisladas de intestino de ratón e *in vivo* en ratones infectados con rotavirus silvestre ECwt [6-9].

Todas estos compuestos y fármacos tienen en común que pueden también modular la vía de NF-kB [7]. Se ha reportado en diversos estudios, como una vía que utilizan diversos virus patógenos en humanos durante la infección de la célula huésped activando la maquinaria de síntesis proteica a su favor para construir sus propios componentes y nuevas partículas virales [10]. NF-kB es un factor de transcripción inducible que controla la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés; participa también en la mayoría de los aspectos fisiológicos celulares desde la inmunidad e inflamación hasta la apoptosis, supervivencia de las células, crecimiento y proliferación [11].

Actualmente en el laboratorio de Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional y acorde con el enfoque en la búsqueda de esclarecer los mecanismos involucrados en la infección viral y contribuir en nuevas alternativas de prevención y el control de la infección viral, se trabaja en determinar los mecanismos por medio de los cuales los diferentes fármacos interfieren con el proceso infeccioso. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar en un modelo *in vitro* como se afecta el proceso de infección con rotavirus en vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR al inhibir NF-kB con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato.

2 ANTECEDENTES.

El laboratorio Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional ha reportado que al interferir el intercambio de grupos tiol-disulfuro en la membrana celular, utilizando reactivo de Ellman (DTNB) y bacitracina, se bloquea la infección por rotavirus [5]. Igualmente, se conocen fármacos que contienen grupos sulfhidrilo, lo cual ha permitido plantear la hipótesis que ellos podrían atenuar o alterar el proceso infeccioso del rotavirus. Uno de estos fármacos es la N-acetilcisteína (NAC) [12], que tiene un grupo sulfhidrilo (tiol) en su estructura y según se reporta inhibe la replicación del HIV, cuya actividad es inducida por el factor de transcripción NF-kB después de la estimulación con TNF- α [13]. En estudios previos, en el grupo de investigación, se ha reportado el efecto de fármacos de uso comercial sobre la infección por rotavirus [14], obteniendo que algunos AINES (ibuprofeno e indometacina), NAC (N-acetilcisteína), vitamina C (ácido ascórbico) y ligandos de PPAR γ (pioglitazona y rosiglitazona) disminuyen la infección por rotavirus tanto *in vitro* en líneas celulares y vellosidades intestinales de ratón, como *in vivo* en ratones [6-9], alterando la formación de partículas infecciosas del rotavirus y restaurándose a niveles normales de expresión las proteínas celulares Hsc70 y PDI, las cuales aumentan luego de la infección con rotavirus [5-9, 15]. Así mismo, recientemente en el laboratorio Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional se ha reportado que la activación de PPAR γ con su agonista pioglitazona conduce a la regulación de esta vía en pro de alterar la cascada de señalización que involucra a NF-kB-COX-2-ROS, requeridas al parecer dentro del proceso infeccioso de rotavirus, puesto que resulta en la reducción de la infección viral [16]. Lo cual apunta a la hipótesis planteada en el laboratorio de que el rotavirus se beneficia de la reacción redox y proinflamatoria en la célula.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los rotavirus son la principal causa de infecciones gastrointestinales en menores de cinco años, donde la diarrea deshidratante es la causa más significativa en los eventos de mortalidad y morbilidad especialmente en países en desarrollo, convirtiendo esta patología en un problema social con elevados costos directos para las familias y los gobiernos.

Hasta el momento la estrategia para mitigar la enfermedad es la vacunación, pero estas solo atenúan los síntomas, no evitan que se presenten, además de no ser accesible a toda la población evidenciando niños sin vacunar. Por lo anterior, se hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias que contribuyan a disminuir la infección, a través del estudio bioquímico del virus y su interacción con las células huésped.

Investigaciones previas en el laboratorio Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional, indican que algunos AINES, agonistas de PPAR γ y antioxidantes como NAC y ácido ascórbico, reducen la infección de rotavirus en ensayos *in vitro* e *in vivo* [7-9]. Sin embargo, es necesario precisar en qué momento los diferentes fármacos interfirieren con el proceso infeccioso, si es en la estructura celular, que se sabe que hay proteínas relacionadas directa o indirectamente con el fármaco o si es sobre el rotavirus. Para lo cual, ya se han adelantado estudios previos en el laboratorio que reflejan que la activación de PPAR γ con su agonista pioglitazona, conducen a la acción o inhibición de vías requeridas para el proceso infeccioso de rotavirus, tales como NF-kB-COX-2-ROS, conllevando a reducir la infección viral [17]. Por lo cual, es necesario determinar la acción específica de NF-kB en la infección de rotavirus.

Por consiguiente y teniendo en cuenta que existen reportes que indican que los agonistas de PPAR γ reducen la producción de óxido nítrico y la actividad de la vía NF-kB [18], este trabajo evaluó en un modelo *in vitro* como se afecta el proceso de infección con rotavirus en vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR al inhibir NF-kB con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato, intentando dilucidar el rol de esta molécula en la infección.

4 JUSTIFICACIÓN.

La vacunación es la principal estrategia para reducir la incidencia de la diarrea deshidratante en infantes, que sin tratamiento oportuno puede llevar a la muerte. Esta solo atenúan los síntomas y no evitan que se presenten, además de tener alto riesgo de producir intususcepción [19-21]. Por otra parte, no es accesible a toda la población, especialmente en países en desarrollo lo cual agregado con lo anterior, genera costos socioeconómicos elevados.

Por esta razón, el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional pretende dilucidar los mecanismos bioquímicos y moleculares de interacción del rotavirus y las células huésped, que favorecen la infección y replicación viral para así poder obtener alternativas en el tratamiento del proceso infeccioso. Los resultados obtenidos de las investigaciones en el laboratorio, han mostrado que, durante la infección por rotavirus, algunas proteínas celulares pueden estar participando de forma directa e indirecta en el proceso infeccioso viral o como defensa de la célula ante el ataque viral. NF-kB es un factor de transcripción que juega un papel importante en el sistema inmunológico, esta proteína regula la expresión de citoquinas, óxido nítrico sintasa inducible, ciclooxigenasa 2 (COX-2), entre otros factores. Diferentes investigaciones indican que la infección con rotavirus activa rápidamente a NF-kB e induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias [16]. Existen evidencias de que la activación de PPAR γ con su agonista pioglitazona conduce a la regulación de esta vía en pro de alterar la cascada de señalización que involucra a NF-kB-COX-2-ROS, requeridas al parecer dentro del proceso infeccioso de rotavirus, puesto que resulta en la reducción de la infección viral [17]. Asimismo, se ha reportado que además de los agonistas del factor de transcripción PPAR γ , la vitamina C disminuyen la infección del rotavirus, aunque en menor porcentaje que NAC [6, 7]. Además se ha validado que otros AINES no reportados también inhiben la infección de rotavirus, como lo hace indometacina [22]. 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 se favoreciera de la activación de vías oxidativas y pro-inflamatorias, de manera que al suministrar a la célula fármacos con capacidad antioxidante 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 NF-kB, ya que se conoce que fármacos con capacidad reductora como NAC, ácido ascórbico, agonistas de PPAR γ o inhibidores de COX-2, como los AINES [7], pueden disminuir o antagonizar vías relacionadas con NF-kB. Además se ha evidenciado que al modular la expresión de PPAR γ (modulador de NF-kB) se disminuye la respuesta inflamatoria en virus como influenza, en virtud del papel antagonista de la actividad de la vía NF-kB, AP1 y STAT [23]. Con base en lo anterior y los resultados obtenidos en previas investigaciones en diferentes moléculas, donde también se observa acción de alguna manera sobre NF-kB, este trabajo evaluó en un modelo *in vitro*, cómo se afecta el proceso de infección con rotavirus en vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR, al inhibir NF-kB con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato.

5 OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la infectividad de rotavirus (ECwt) en vellosidades intestinales de ratones adultos ICR, tratados con inhibidores de NF-kB.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

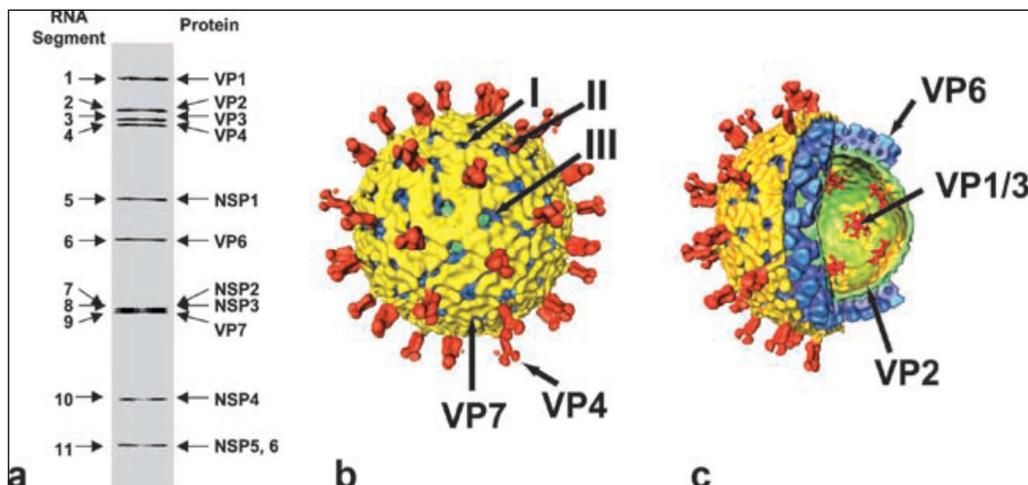
- Determinar cambios en la expresión de NF-kB, al tratar con inhibidores las vellosidades intestinales de ratones adultos ICR, infectadas con Rotavirus ECwt.
- Establecer la acción de los inhibidores de NF-kB en enterocitos antes y en diferentes tiempos después de infectar con rotavirus ECwt.
- Determinar cambios en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO o "ROS"), al tratar con inhibidores de NF-kB vellosidades intestinales de ratones adultos ICR infectadas con Rotavirus ECwt.

6 MARCO TEÓRICO.

6.1 Generalidades de los rotavirus.

El rotavirus es un miembro de la familia *Reoviridae*, compuesta por siete diferentes grupos (nomenclatura A-G). Solo los grupos A, B y C han sido identificados en humanos, y son los miembros del grupo A los principales causantes de gastroenteritis en humanos. Se caracterizan por su simetría icosaédrica sin envoltura; con tres capas concéntricas de proteínas en su cápside que engloban al genoma viral.

Figura 1. Diagrama de la partícula viral con sus proteínas estructurales y no estructurales en las tres capas: a) Electroforesis del genoma viral; (b-c) posición de las seis proteínas estructurales en las tres capas de la partícula viral madura (TLP) [26].



Su genoma está compuesto de 11 segmentos de ARN bicatenario, que codifican seis proteínas estructurales ((VP1, VP2, VP3, VP4, VP6y VP7) y seis no estructurales (NSP1 - NSP6) (figura 1) [24-26]. Es un virus 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 [24]

6.2 Proteínas estructurales y no estructurales de Rotavirus.

Las tres capas concéntricas de proteínas del virion maduro engloban al genoma viral, el cual consta de once segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA). La capa más interna del virión está conformada en mayor proporción por 60 dímeros de la proteína VP2, que rodea al genoma del virión y se caracteriza por presentar propiedades altamente inmunogénicas [27]. La VP1 se caracteriza por ser un componente común de las partículas virales, con actividad de ARN polimerasa (transcriptasa o replicasa) [28]. La VP3 es una guaninil-metil transferasa y a través de su actividad enzimática permite la formación de ácido ribonucleico mensajero (mARN). La VP6 con doscientos sesenta trímeros, es la proteína más abundante e inmunogénica, constituye la capa intermedia del virión. Posee un dominio inferior que consiste en un racimo de hélices- α que le permite el contacto con VP2, mediante interacciones predominantemente hidrofóbicas y un dominio lejano con ocho hojas plegadas antiparalelas- β , que hacen contacto con las proteínas VP7 y VP4 mediante varios residuos cargados [25, 29]. La capa más externa de superficie del virus está compuesta por 780 copias de la glicoproteína VP7, organizada en forma de trímeros, está involucrada en el proceso de penetración a la célula huésped [30]. La VP4 formada por 60 espículas, se proyectan hacia el exterior de la superficie viral, actuando en el reconocimiento de los receptores celulares para la adherencia y entrada del virus a la célula huésped [26, 31-34]. La proteína VP4 es fragmentada por la tripsina generando dos proteínas de menor peso molecular, el dominio distal corresponde a VP8* y el central a VP5* [31-34], además de tener funciones esenciales en el ciclo de vida del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración a la célula hospedera, genera un aumento en su capacidad infectiva, por lo que es indispensable a la hora de determinar la virulencia e inducir la formación de anticuerpos neutralizantes [25, 26, 31-34]. 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 [35].

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

(viroplasmos) 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 y es codificada por el gen 11 en un marco abierto de lectura desfasado [36].

6.3 Características del ciclo infeccioso de rotavirus.

El rotavirus inicia su ciclo infeccioso uniéndose a receptores de superficie celular, que le permiten penetrar la membrana plasmática, gracias a los cambios conformacionales que sufre su capa más externa, donde involucra el clivaje por tripsina de la proteína VP4 en dos polipéptidos llamados VP8* y VP5* [31, 37, 38], y la acción de la proteína VP7 (Figura No. 1). 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 [39, 40]. 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 $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ [9, 15] y a la proteína Hsc70 [40, 41] y PDI [42]. 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 [43, 44]. 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 [41, 45]. 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 [46].

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* [35, 47]. Varias investigaciones han encontrado que

este virus se une a la superficie celular por interacción con la integrina $\alpha 2\beta 1$ [41]. Después del contacto inicial del rotavirus con AS y la integrina $\alpha 2\beta$, el virus interactúa con tres proteínas adicionales de la célula huésped: Hsc70, $\alpha \nu \beta 3$ y $\alpha \nu \beta 2$ [9, 41]. La interacción viral con Hsc70 es mediada por un dominio en VP5* [41, 44, 48].

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 [26].

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 van al interior del retículo endoplásmico y adquieren durante este proceso la tercera capa proteica, dando lugar a la partícula madura [49]. 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 [44].

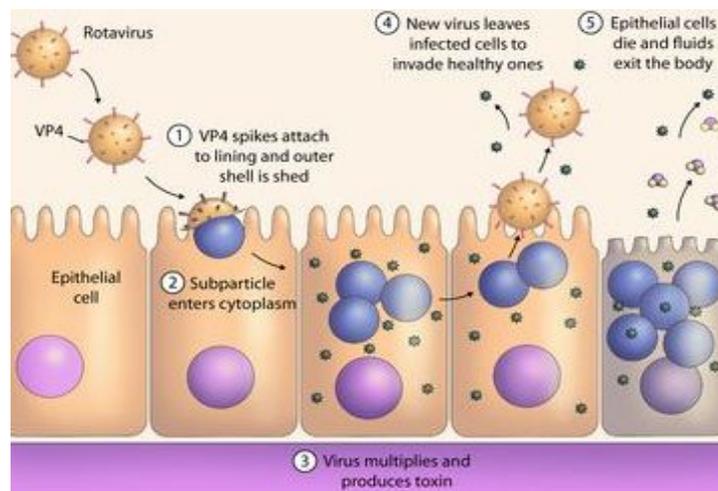
Poco tiempo después de su entrada, el virus se apodera de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula, de modo que la mayoría de las proteínas que son sintetizadas durante la infección, son las proteínas virales y la síntesis de proteínas celulares, se ve casi abatida completamente. Los mRNAs 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 [26].

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 viroplasmias, que están compuestas de grandes cantidades de RNA y proteínas virales. 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 [25] (Figura No. 2).

Todo el ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular, sin necesitar el núcleo de la célula [35].

Figura 2. Etapas de infección por Rotavirus; (1). Reconocimiento de receptor celular por VP4 de Rotavirus, (2). Ingreso de subpartícula al citoplasma, (3). Replicación del virus, (4). Liberación de nuevas partículas virales y (5). Células muertas liberadas. (Tomado de <http://rotavirus.wikispaces.com/Pathophysiology>)



6.4 Moléculas celulares involucradas en la patogénesis del rotavirus.

La infección del rotavirus a la célula huésped es un proceso de múltiples pasos que involucra desde interacciones de varios ligandos, a una serie de cambios conformacionales en las proteínas de la cápside, por la interacción del virus a receptores de membrana y

moléculas celulares post – infección [41, 50], que actúan de forma directa o indirecta en el proceso infeccioso o como defensa de la misma célula.

6.4.1 Proteína disulfuro isomerasa (PDI).

La proteína disulfuro isomerasa (PDI) de 56 kDa y aproximadamente 490 aminoácidos, hacen 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 e importadas al lumen de éste, para ser secretadas o incorporadas en la membrana celular. Las PDIs presentan dos dominios externos (a y a') que son catalíticos y proporciona la actividad oxidoreductasa 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 [42, 51].

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 [52].

Respecto al rotavirus, PDI está involucrada en la formación y reordenamiento de los enlaces disulfuro intra-moleculares para la maduración de la proteína rotaviral VP7, que se produce después de la traducción [5, 9, 15]. 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 [53, 54].

6.4.2 Proteína de choque térmico de 70KDa (HSP70) y proteína de choque térmico constitutiva, 70KDa (HSC70).

Son proteínas chaperonas, pertenecen a la familia de las proteínas de choque térmico, las cuales se expresan de manera ubicua y constitutiva en las células eucariotas y procariotas. Esta familia se clasifica según su expresión en la célula, como proteínas de expresión constitutiva (HSC70) y en las proteínas de expresión inducible (HSP70), la cual se ve aumentada cuando se exponen las células a estrés por temperatura alta, inanición, inflamación, suspensión de agua, o deficiencia de nitrógeno [55].

Las HSP están involucradas en el plegado y translocación de proteínas, la regulación de apoptosis, la estabilización del citoesqueleto, el estiramiento de fibras del músculo, controla la calidad en la producción de colágeno y degradación de proteínas intracelularmente. La función de chaperona molecular ayuda al mantenimiento de la correcta estructura de proteínas desnaturalizadas, durante el estrés del oxidativo [56].

Las infecciones virales de células de mamífero producen a menudo alteraciones de la síntesis de las proteínas de estrés térmico, sobre todo en las HSPs residentes del retículo endoplasmático, además estudios han identificado que la forma constitutiva HSC70 juega un papel importante en el proceso para la entrada de rotavirus en las células intestinales [9, 41, 55].

Se ha identificado que la forma constitutiva HSC70 juega un papel importante en el proceso, para la entrada de rotavirus en las células MA104 [14, 43, 48, 57] e intestinales en ratón lactante de la cepa ICR [58].

6.4.3 Ciclooxygenasa-2 (COX-2).

La Ciclooxygenasa (COX) o prostaglandina-endoperóxido 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 prostanoides. La COX-2 se expresa tras

inducción inflamatoria, aunque es constitutiva en bajas cantidades en el cerebro, corazón, ovarios, músculos estriados, SNC y riñón [59, 60].

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 kB (NF-kB) mediante especies reactivas de oxígeno. Finalmente, el incremento del Ca⁺⁺ intracelular que causa la PGE₂, al activar el receptor EP-1 puede regular la expresión de la COX-2. El aumento de Ca⁺⁺ intracelular causa la activación de la proteína cinasa C (PKC), la cual activa el NF-kB [59].

Uno de los factores importantes que contribuyen a mantener este constante proceso, 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, contribuyendo a que se perpetúe el círculo de inflamación durante todo el transcurso de la enfermedad [61].

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 [7]. Es muy probable que PGE₂ esté involucrada en la síntesis de proteínas virales y la producción de nuevas partículas de rotavirus [22, 60].

6.4.4 Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ).

El receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ) pertenece a la familia de los receptores nucleares de hormonas, que directamente regulan la transcripción de genes diana [62]. PPAR γ , además juega un papel crucial en la adipogénesis y la sensibilización a la insulina. Por otra parte, PPAR γ se ha reportado que afectan la proliferación celular y diferenciación de las vías en varias neoplasias [63]. Esta proteína se encuentra ampliamente expresada en el organismo, incluyendo el tejido adiposo, vascular,

cardíaco y el sistema inmune. Existen además otras isoformas de PPAR γ codificadas por diferentes genes: PPAR α y PPAR β/δ [63].

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 [64]. Los ligandos de PPAR γ incluyen al metabolito natural 15-deoxy- Δ 12,14 Prostaglandina J2 [65], ácidos grasos poliinsaturados, fármacos antiinflamatorios no esteroideos [66] y ligandos sintéticos como los miembros de la familia de tiazolidindionas (TZD) [67]. 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 γ ejerce también efectos antiinflamatorios y posiblemente cardioprotectores [68, 69]. Además investigaciones hechas en el laboratorio, propone que la activación de PPAR γ 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-kB-COX-2-ROS, lo que resulta en la reducción de la infección viral [7, 16].

6.4.5 Factor nuclear *kappa* B (NF-kB).

NF-kB es un factor de transcripción que juega un papel importante en el sistema inmunológico [70-72]. Fue identificado por primera vez como una proteína reguladora de la expresión de los genes de la cadena ligera kappa en los linfocitos B [11]. Posteriormente, se descubrió que se expresaba prácticamente en todos los tipos de células y que está implicado en la transcripción de un amplio grupo de genes [73], que regulan la expresión de citoquinas, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), cicloxigenasa 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 de receptores Toll-like y del receptor/IL-1. NF-kB también juega un papel en el desarrollo y la actividad de un número de tejidos, incluyendo el sistema nervioso central [73, 74].

6.4.6 Familia NF- κ B.

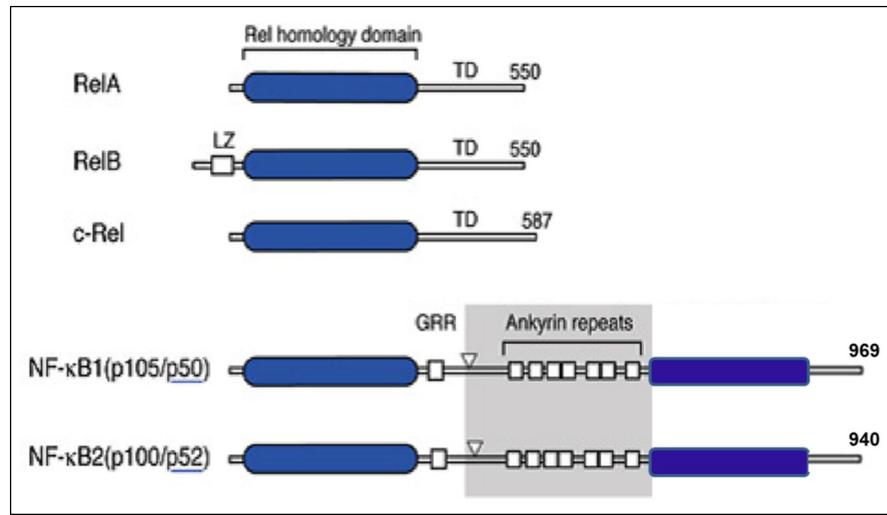
NF- κ B forma parte de la familia Rel, constituida por cinco proteínas que contienen dominios homólogos y que forman entre ellas homo o heterodímeros. Estas proteínas son: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB [75-77]. Los miembros de la familia Rel se clasifican en dos subfamilias:

Subfamilia 1: Incluye los miembros con dominio TAD (del inglés transcription activation domain) RelA, c-Rel y RelB, que son sintetizados en su forma madura.

Subfamilia 2: Incluye los miembros sin dominio TAD p50 y p52, los cuales son productos maduros generados a partir de los precursores p105 y p100. p105 p100 contienen repeticiones de ankirina que son degradadas durante la conversión a la forma activa [10, 78].

Todos los miembros de la familia NF- κ B presentan un dominio N-terminal común llamado RHD (del inglés Rel homology domain). Este dominio está formado por 300 aminoácidos y es responsable de la dimerización, de la asociación con el inhibidor I κ B, de la unión con los motivos κ B del DNA. En este dominio es donde se encuentran las secuencias de localización nuclear NLS (del inglés Nuclear Localization Signal) [72, 79]. Los miembros de la subfamilia 1 presentan un dominio de activación transcripcional llamado TAD, en la región C-terminal, el cual es necesario para la regulación positiva de la expresión génica [78, 79] (figura 3).

Figura 3. Miembros de la familia NF- κ B. En los mamíferos la familia de factores de transcripción NF- κ B se compone de cinco miembros: p65/RelA, p52, p50, RelB y c-Rel. El número de aminoácidos de cada proteína se indica a la derecha. Se muestra el sitio presumible de clivaje para p100 (aa 447) y p105 (aa433). (RHD) dominio de homología Rel; (TD) dominio de activación transcripcional; (LZ) cremallera de leucina [80].



6.4.7 Proteínas I κ Bs.

NF- κ B se encuentra en el citoplasma unido a sus inhibidores I κ B (I κ B α , I κ B β , B ϵ), en las células que no han sido estimuladas, previniendo su entrada al núcleo. Las proteínas I κ B contienen un dominio N-terminal, seguido por una serie de repeticiones de ankirina importantes en la unión al heterodímero de NF- κ B [10]

Cuando estas células son estimuladas, I κ B es fosforilada por kinasas específicas, causando una rápida degradación del I κ B por el proteosoma. La liberación de NF- κ B de I κ B resulta en la translocación de NF- κ B al núcleo, donde se une a secuencias específicas en las regiones promotoras de genes diana [11].

6.5 Activación de NF- κ B.

Hay dos vías que conducen a la activación de NF- κ B (Figura 4). Las dos vías mejor descritas son la canónica y no canónica o las rutas clásicas y alternativas, respectivamente.

El paso común en estas dos rutas es la activación de un complejo I κ B kinasa (IKK), el cual consiste en subunidades catalíticas quinasa (IKK α y /o IKK β) y la subunidad reguladora asociada IKK-g/NEMO [80, 81].

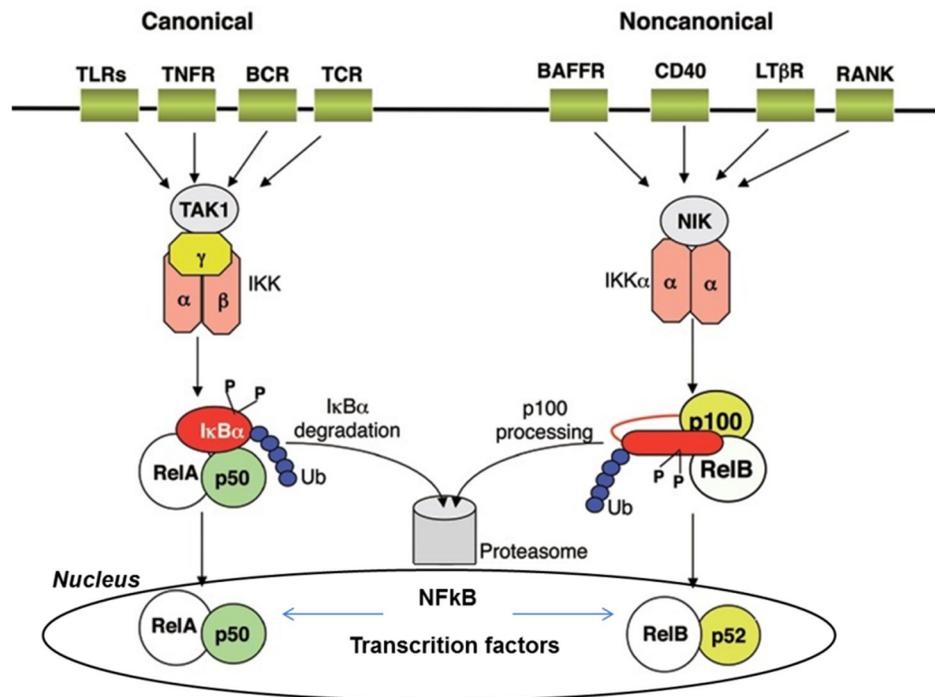
6.5.1 Ruta clásica o canónica.

La ruta clásica está implicada en la señalización proinflamatoria, se activa por las citoquinas inflamatorias (IL-1 y TNF- α), TLR y receptores de antígeno y es esencial para la inmunidad innata. Las señales inducidas por estos estímulos confluyen en un regulador central de NF- κ B, el complejo IKK (I κ B quinasa). El complejo IKK consta de múltiples subunidades con actividad quinasa. Cuando se estimula una célula, el complejo IKK fosforila I κ B en residuos de serina, induciendo la disociación de NF- κ B [18, 70, 72]. El I κ B recién liberado se une a la ubiquitina y es degradado por la subunidad 26S del proteasoma. Así se liberan complejos de NF- κ B, predominantemente el dímero p50/RelA, que se puede translocar al núcleo donde se une a elementos específicos en el ADN, y activa los promotores de la transcripción génica. Esto da como resultado la activación de muchos genes incluyendo los de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL18, IL-33, TNF- α [76].

6.5.2 Ruta alternativa o no canónica.

La ruta alternativa activa el complejo RelB/p52 mediante un mecanismo basado en el procesamiento de p100, en lugar de la degradación de I κ B. La evidencia genética sugiere que esta vía regula funciones biológicas importantes, tales como la organogénesis linfoide, la supervivencia y maduración de las células B, la activación de las células dendríticas, entre otras [83].

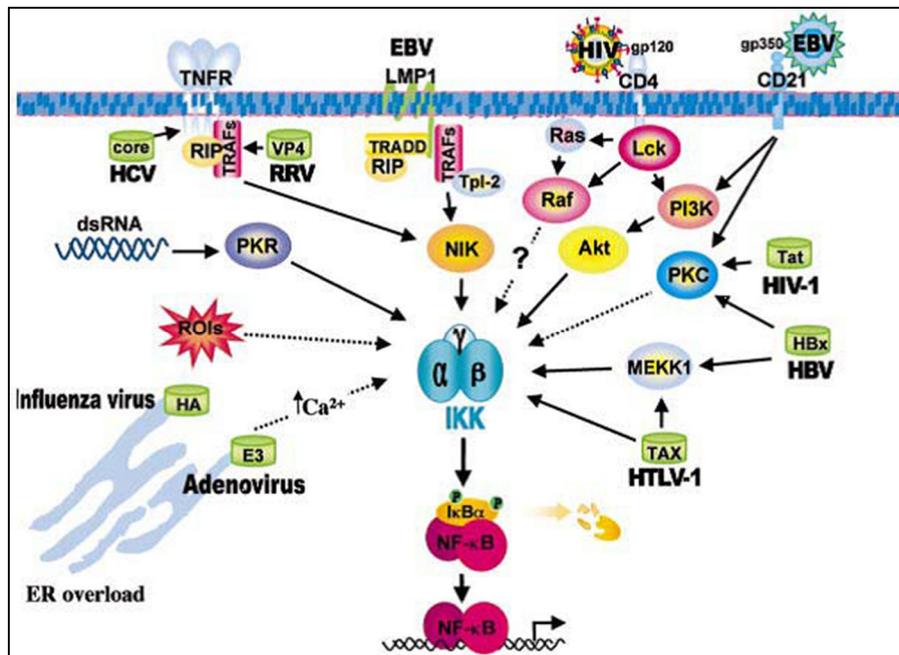
Figura 4. Vía Canónica y No Canónica para la activación de NF- κ B. La vía canónica es provocada por los TLR y citoquinas pro-inflamatorias, como TNF α y IL-1, lo que lleva a la activación de RelA que regula la expresión de genes pro-inflamatorios y la supervivencia celular. La vía no canónica se activa por vía LT β , CD40L, BAFF, y RANKL, pero no TNF α , resultando en la activación del complejo RelB/p52. La activación de la vía alterna regula los genes necesarios para la activación de las células B [83].



6.6 NF- κ B y Virus.

El hecho de que la activación de NF - kappa B sea un evento rápido que se produce a pocos min de estimulación, que no requiere la síntesis de proteínas y es capaz de influir en varios pasos críticos en la vida de la célula huésped [7, 8], hace de la vía NF- κ B un blanco muy atractivo para el virus invasor. De hecho, muchos virus, entre ellos varios patógenos humanos, como el VIH-1, el virus linfotrópico humano tipo (HTLV-1), el virus de la influenza, hepatitis B y C [7, 8], han evolucionado en diferentes estrategias para modular la vía de NF- κ B, la mayoría de los cuales convergen en la activación de IKK [10] (Figura 5).

Figura 5. Diferentes mecanismos de la activación de NF- κ B por virus. Glicoproteínas de la envoltura viral (HIV gp120 y EBV gp350) activan la señalización, a través de la participación de receptores celulares (CD4 y CD21). La acumulación de dsRNA virales activa PKR, que a su vez estimula la IKK. Sobrecarga del RE causada por la producción masiva de la glicoproteína viral (hemaglutinina HA del virus de la gripa, proteína E3 de adenovirus) conduce a la posible activación de la vía NF- κ B regulada por la señal de calcio o radicales oxidativos (ROI) [12].



En algunos casos, la unión de la partícula viral a su receptor de membrana es suficiente para desencadenar la cascada de señalización que activa NF- κ B. En otros casos, los productos virales, como dsRNA y proteínas virales, pueden ser responsables de la activación de NF- κ B [10].

En el caso del virus de la influenza y el adenovirus, en el que la acumulación de proteínas virales (la hemaglutinina (HA) y la proteína E3/19K adenovirus) en la membrana del retículo endoplasmático (ER), provocan una “Sobrecarga del ER” y con ello la liberación de calcio [70]; estas altas concentraciones de calcio activan la proteína cinasa C dependiente de calcio, la cual fosforila a I κ B, lo que conlleva a su disociación de NF- κ B, permitiendo así la translocación de este al núcleo [10, 82]

Se ha reportado que la infección con rotavirus activa rápidamente a NF- κ B e induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias [7, 8, 83-85]. Además, estudios indican que distintas proteínas virales codificadas por el HCV, RRV (rotavirus), EBV, HBV, HTLV-1 y VIH-1 activan NF- κ B, mediante la interacción con las diferentes vías de señalización celular [10].

6.7 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 reactivos; son producidas en el organismo principalmente por la cadena de transporte de electrones [8]. 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 ($ONOO^{\cdot}$) [7, 9]. 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 (glutatión) y a través de una mayor producción de especies reactivos 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 [86-91]. Las EROs pueden ser moléculas de señalización o de estimulación de la proliferación celular [7, 9], lo que contribuye a una defensa antiviral [92]. Sin embargo, un fuerte aumento de su producción es perjudicial para células, debido al estrés oxidativo y al daño de los componentes celulares [7].

6.8 INHIBIDORES DE NF-kB.

6.8.1 Curcumina (CUR).

La curcumina, también conocido como Diferuloilmetano, es un compuesto de color amarillo identificado como el principio activo de la planta *Cúrcuma longa* [93]. Además de ser un agente pleiotropico, está asociado con diversos efectos farmacológicos incluyendo actividades antiinflamatorias, antioxidantes, anti-proliferativas, anticancerosas, antivirales y antibacterianas [94, 95]. Varios modelos animales y estudios en humanos, demostraron que la curcumina es altamente segura incluso en dosis muy altas [94, 96-98]. Su efecto ha demostrado bloquear muchas reacciones en las que NF-kB desempeña un papel importante. *Singh S. Aggarwal B (1995)* reportaron, que curcumina inhibe en una etapa en la cascada de activación de NF-kB, la cual se produce antes de la fosforilación de I κ B α , pero después del punto en el que convergen diversas señales transducidas por diferentes estímulos [99]. Soluble en etanol (1mg/ml) o DMSO (25mg/ml) según casa comercial (Enzo Life Sciences Farmingdale, NY, USA).

Algunas propiedades fisicoquímicas de curcumina son:

Peso molecular: 368.4 g/mol

Formula molecular: C₂₁H₂₀O₆

Solubilidad: Soluble en etanol y ácido acético, poco soluble en agua.

Toxicidad: La LD50 fue > 2000 mg / kg. Al administrar oralmente 1-5 g / kg peso corporal de curcumina en ratas, no indujeron efectos tóxicos [100].

Absorción: Baja absorción gastrointestinal, estudios en ratas administrando 2 g vía oral de curcumina resulto en una concentración plasmática de menos de 5 μ g / ml, indicando deficiencia de absorción.

farmacodinamia: En ratas la aplicación intravenosa de 25 mg / kg de curcumina en peso corporal mostro un aumento del flujo de bilis en un 80 y 120% [100].

6.8.2 Dietilditiocarbamato (DC).

El dietilditiocarbamato o dietil-carbamato es un metabolito del disulfiram, que ha sido conocido como un potencial agente de tratamiento del alcoholismo [101-103], Además de ser utilizado en tratamientos del VIH, las enfermedades neurodegenerativas [104] y en estudio clínicos tales como el tratamiento de la toxicidad por metales y cáncer [105, 106]. Es una molécula que interfiere en la vía de señalización de NF-kB al afectar la fosforilación de IκB y su degradación en el proteosoma [105, 107, 108]. Soluble en agua y DMSO (20mg/ml) según casa comercial (Enzo Life Sciences Farmingdale, NY, USA).

Algunas propiedades fisicoquímicas de curcumina son:

Peso molecular: 148.3 g/mol

Formula molecular: C₅H₁₀NS₂

Solubilidad: Soluble en agua.

Toxicidad: La LD50 fue 2830 mg/kg. Al administrar oralmente 100 mg / kg peso corporal de dietilditiocarbamato en ratas, no indujeron efectos tóxicos [109].

Absorción: Se determinó una vida media de absorción de 26 minutos, cuando se inyectó dietilditiocarbamato disuelto en PBS 2M. Fue inyectado en el intestino delgado de ratas Wistar macho adultas a una dosis de 25 mg / kg [110].

6.8.3 Dietil-maleato (maleato de dietilo) (DM).

El dietil-maleato es el éster dietílico del ácido maleico y un compuesto reductor del glutatión, que a la vez inhibe NF-kB. En células de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), dietil-maleato (DM) disminuye la activación de NF-kB tanto directa como indirectamente. Al no ejercer algún efecto reversible el modulador natural glutatión (GSH) o el activador β-mercaptoethanol en el factor nuclear en la acción de bloqueo por DM, indica que este tiene interacciones directas con las subunidades de NF-kB relacionando sus subunidades proteicas, así mismo DM alquilando GSH, puede actuar indirectamente sobre NF-kB

reduciendo los niveles nucleares de GSH alterando así el equilibrio redox nuclear afectando la unión de NF- κ B al ADN [111]. Soluble en etanol según casa comercial (Enzo Life Sciences Farmingdale, NY, USA).

Algunas propiedades fisicoquímicas de curcumina son:

Peso molecular: 326.07 g/mol

Formula molecular: $C_{21}H_{20}O_6$

Solubilidad: soluble en etanol, poco soluble en agua.

Toxicidad: La LD50 fue 3200 mg/kg. Al administrar oralmente concentraciones ≥ 200 mg / kg peso corporal de dietil-maleato en ratas, no indujeron efectos tóxicos [112].

7 MATERIALES Y MÉTODOS.

Este proyecto se desarrolló en el laboratorio Biología Molecular de virus de Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Es un estudio de investigación experimental, con el fin de evaluar en un modelo *in vitro*, como se afecta el proceso de infección con rotavirus en vellosidades intestinales aisladas de ratón ICR al inhibir NF- κ B con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato.

7.1 Animales.

Se usaron ratones provenientes del bioterio del departamento de farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) a cargo del Dr. Luis Fernando Ospina, y otros fueron comprados en el bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS), de la cepa ICR (Institute of Cancer Research) de 52 días de edad, con peso promedio entre 25 y 30 gramos, obtenidos mediante cruces entre individuos no consanguíneos (animales exocriados), animales genéticamente heterogéneos [113].

7.2 Virus.

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

7.3 Reactivos.

Se utilizaron los siguientes sueros hiperinmunes: anti-ECwt generados en conejo y cobayo. 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 son: anti-PPAR γ (SC6285), anti-COX-2 (SC18619), producidos en cabra, anti-p-NF- κ B p50 (ser 337 es la forma activa que se transloca al núcleo) (SC33022) generado en conejo, Todos los anticuerpos obtenidos comercialmente estaban a una concentración de 200 μ g/ml y provenían de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA.

Los Acs comerciales que se utilizaron son: cabra anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (SC2313), conejoanti-cabra IgG (SC2020) y cabra anti-conejo IgG marcados con FITC (SC2359). Todos los anticuerpos secundarios, se encontraban a una concentración de 400µg/ml provenientes de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA. Se utilizó el Kit Oxidative Stress I No.8401001 para la detección de especies reactivas de oxígeno (Thermo Scientific Waltham, MA, USA).

Los inhibidores de NF-κB que se utilizaron son: curcumina (BML-E1135), dietilditiocarbamato de sodio trihidratado (ALX-400-003) y dietil-maleato (maleato de dietilo) (ALX-280-017), todos del laboratorio Enzo Life Sciences Farmingdale, NY, USA.

Las concentraciones utilizadas con los inhibidores específicos de NF-κB en este estudio se determinó con base en literatura de estudios previos, donde evalúan la acción de curcumina en cultivos celulares con variación en las concentraciones entre 20 y 200 µM [99, 114, 115], algo similar presenta dietil-carbamato en la variación en las concentración utilizadas en investigaciones entre 10 a 250 µM [104, 116, 117] y para el caso de dietil-maleato existen reportes en las concentraciones no tóxicas utilizadas que llegan hasta 0.250 mM [111].

7.4 Aislamiento de vellosidades intestinales.

La extracción de vellosidades de intestino delgado de los ratones, se realizó en la 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, República de Colombia; se limpió la piel con alcohol y se realizó un corte longitudinal. Se cortó 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 lavó con 5ml de medio de cultivo con antibiótico (Kanamicina 100µg/ml, Ampicilina 100µg/ml y Anfotericina B 2,5µg/ml).

Posteriormente se cortó el intestino en fragmentos de aproximadamente 0,5 cm en presencia de 7 ml de MEM, que contenían EDTA 1,5 mM. Los fragmentos se recuperaron y se incubaron por 15 min a 37 °C con agitaciones constante de 400 r.p.m. Después se disgregaron con una punta de micropipeta de 1ml, cortada en el extremo y se pasaron por

un cedazo o malla estéril (1mm² de poro) sobre una caja de Petri esterilizada. Los fragmentos que no pasaron la malla, se colocaron nuevamente en el tubo de centrifuga con 5 ml de MEM con EDTA, y se realizó una segunda extracción bajo las mismas condiciones.

A continuación, se mezclaron las vellosidades que pasaron el poro de la malla en las dos extracciones, se centrifugaron durante 10 min a 3.000 r.p.m., y se descartó el sobrenadante. Para retirar residuos de EDTA se re-suspendió el precipitado en 5 ml MEM, se centrifugo nuevamente y se descartó el sobrenadante. Las vellosidades se re-suspendieron en 5 mL de MEM, para ser usadas en los análisis requeridos.

7.5 Tratamiento con inhibidores de NF-kB sobre la infección por rotavirus en las vellosidades intestinales de ratones adultos ICR infectadas con rotavirus ECwt.

Las vellosidades se infectaron con rotavirus ECwt previamente activado con tripsina e incubado a 37 °C durante 10 minutos. Se incubó la solución vellosidades – virus 1 h a 37 °C en placa de 96 pozos y luego se adicionaron los inhibidores curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato, disueltos en el disolvente polar de baja toxicidad DMSO ((concentración final máxima de 0.1% vol:vol medio, en el cultivo) o metanol (concentración final máxima de 0.1% Vol:vol medio, en el cultivo), en las concentraciones de 10µM, 25µM, 50µM, 75µM y 100µM por duplicado. Se incubaron las cajas por ~12 horas a 37°C en 5% de CO₂, utilizando como controles las células infectadas sin tratamiento y células sin infectar, sin tratamiento. Transcurrido este tiempo post-tratamiento (p.t.), se cosecharon por separado los tratamientos para determinar el efecto de cada uno de éstos, utilizando las técnicas de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, Western Blot (WB) y Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).

7.6 Inmunocitoquímica de vellosidades aisladas.

Para la detección de antígenos virales, las vellosidades aisladas se fijaron con la mezcla etanol-ácido acético (3:1), se lavaron con PBS y se colocaron en una laminilla cubreobjetos, las cuales se secaron a 50°C durante 30 min. Se permeabilizaron con tritón 0,5% o con SDS 0,1% durante 15 min, se les adicionó cloruro de amonio 50 mM por 30 min, se lavaron dos veces con PBS y se dejaron secar. Las células adheridas a la laminilla se incubaron

con 20 μ L de un anticuerpo (Ac) policlonal, que reconoce proteínas estructurales de rotavirus (1:200 en PBS) en una cámara húmeda a 37°C durante 1 h. Los anticuerpos fueron generados en conejo por trabajos previos. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS para retirar el exceso de anticuerpo, se añadieron 20 μ L de anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (HRP, 0,13 μ g/ml) y se incubó por 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se lavaron las células una vez con PBS y se reveló utilizando 20 μ 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 min. Finalmente, las células se lavaron con PBS para retirar el exceso de carbazol. Las laminillas fueron fotografiadas en 10 campos representativos con un microscopio Van Guard utilizando un objetivo 100X.

7.7 Inmunofluorescencia.

Para la inmunofluorescencia, se utilizaron células adheridas a laminillas, con la misma técnica que se realizó la inmunocitoquímica. Luego de lavarlas con PBS se les agregó anticuerpos primarios (Ac) en PBS, a una concentración de 0.2 μ g/ml contra pNF-kB, PPAR γ y COX-2; Ac anti-pNF-kB p50 (ser 337) (SC33022) generado en conejo, anti- PPAR γ (SC7273) y anti-COX-2 (SC19999) generados en Cabra, incubando por 1 h a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se les adicionó como anticuerpos secundarios, un conjugado con FITC anti-conejo o anti-Cabra (0,8 μ g/ml en PBS), se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 45 min, se lavaron con PBS y se fotografiaron en microscopio de fluorescencia (Van Guard) utilizando una lente 100X. La determinación de la medición de la fluorescencia se realizó por medio del programa ImageJ (Analyze, measure).

7.8 Elisa de captura.

Las vellosidades aisladas tratadas y no tratadas con los inhibidores de NF-kB, se lisaron con buffer RIPA 1X pH 8.0 (150mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50mM Tris) y se sonicaron por 3 min a una amplitud de 30%, se adicionó azida de sodio 15mM y se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso.

En placas de 96 pozos se utilizó como anticuerpo de captura, un policlonal que reconoce proteínas estructurales de rotavirus, generado en cobayo (1:1000 en 200µl de PBS), se incubaron a 37°C por dos horas. Posteriormente se bloqueó con leche descremada 5% o caseína al 1% durante una hora a 37°C, se lavaron los pozos con PBS y se adicionaron los lisados celulares. La placa se incubó a 4°C durante toda la noche; se lavaron tres veces con 200 µl de PBS y se adicionó Ac primario, que reconoce antígenos estructurales de rotavirus generados en conejo (0,20µg/ml en PBS). Se incubó a 37°C por una hora, se lavaron tres veces con PBS y se adiciono anti-conejo conjugado con peroxidasa (HRP, 0,13 µg/ml en PBS) en PBS. Se reveló utilizando sustrato con OPD (O-fenilenediamina diclorhidrato) diluido en Buffer estable de peroxidasa. Se utilizaron los lisados de las vellosidades que no fueron infectadas como control negativo. Las placas de ELISA fueron leídas a 490 nm en un lector Elisa Stat Fax 303/Plus.

7.9 Detección de especies reactivas de oxígeno.

La detección de las especies reactivas de oxígeno se llevó a cabo por medio de la utilización del Kit Oxidative Stress en donde a las vellosidades aisladas infectadas tratadas y no tratadas con los inhibidores y mantenidos en medio DMEM, se adicionó 16µg/ml de dihydroethidium (DHE) y 0,000016µg/ml de Hoechst 33342, se incubó a 37°C por 30 min, después se centrifugó por 2 min a 3000 rpm y el sobrenadante se desechó. Posteriormente se agregó paraformaldehido al 4% y se incubó a 37°C por 30 min, después se centrifugó por 2 min y el sobrenadante se desechó; luego las células se lavaron con 100 µl de PBS y finalmente se adicionó 200 µl de PBS y se fotografiaron en el microscopio Van Guard utilizando una lente 100X.

7.10 Western blot.

Las vellosidades aisladas infectadas o no infectadas y tratadas con los inhibidores fueron lisadas con buffer RIPA y sonicadas durante 3 min, a una amplitud de 30% (tres veces por 1 minuto con descanso de 30 segundos), en presencia de fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF). El lisado se almacenó a -70 °C hasta su uso. Se hicieron electroforesis previas, para homogenizar las cantidades de proteína que se usarían para hacer el western blot de las

vellosidades infectadas, sin infectar e infectadas, que se les aplicó los diferentes tratamientos.

A las muestras se les adicionó buffer 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, se analizaron por electroforesis SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana PVDF con buffer de transferencia, que contenía Glicina 129 mM, Tris 25 mM y Metanol al 10%. Consecutivamente la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5%, luego y se lavó 3 veces con PBS, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente a cada proteína: anti-PPAR γ , anti-COX-2 generado en cabra y anti-pNF-kB, generado en conejo con una concentración 0.2 μ g/ml en PBS. Se realizaron 3 lavados con PBS y posteriormente se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP, 0.4 μ g/ml). Se reveló con luminiscencia (Pierce).

7.11 Reinfeción.

La técnica de ELISA no discrimina entre proteínas virales aisladas y los viriones completos. Por esto, no es posible determinar si los cambios observados en la infección se deben a que los fármacos inducen señales, que afectan la síntesis de las proteínas virales y esto repercute en el ensamblaje de viriones o disminuye la síntesis de proteínas virales, pero sin afectar el ensamblaje en viriones. Para esto, las vellosidades previamente aisladas, infectadas y tratadas fueron congeladas y descongeladas dos veces con el fin de lisarlas, posteriormente se agregó tripsina 10 mg/ml y se realizaron diluciones de estas vellosidades. Los lisados se agregaron a nuevas vellosidades no infectadas, sembradas en cajas de 24 pozos adicionando 200 μ l por pozo, por duplicado. Las vellosidades fueron cosechadas a las ~12 horas post infección (h.p.i.), fijadas y analizadas mediante ELISA (procedimiento anteriormente descrito).

7.12 Viabilidad con azul de Tripán.

Para determinar la citotoxicidad de los inhibidores usados en los experimentos, a las vellosidades aisladas, se evaluó la viabilidad celular con el reactivo Azul tripan (93595 Sigma-Aldrich), que es un coloide que se introduce en el interior de las células que

presentan ruptura en la membrana. A células tratadas con los diferentes fármacos Cur, DC, DM, e incubadas durante ~12 horas a 37°C, se agregó el reactivo Azul tripan en una concentración 1:1 (v:v) durante 1 min y se contó con ayuda del microscopio, para determinar la viabilidad celular. Estos resultados fueron comparados con el porcentaje de células viables sin ningún tratamiento y células tratadas con H₂O₂ a una concentración de 0,1 mM, durante el mismo tiempo a 37°C, el cual produce peroxidación lipídica de la membrana celular.

7.13 Análisis de datos.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 5, se aplicó la prueba paramétrica de ANOVA de dos vías y prueba de comparación múltiple de Dunnett, donde la significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P<0.001(altamente significativo).

7.14 Sujetos de estudio, tamaño de la muestra y reclutamiento.

El proyecto es una investigación experimental que usó Ratones ICR, machos, de ~27 gr de peso y de edad de 52 días, como población de estudio, estos ratones fueron donados por el bioterio de farmacia y otros comprados en el bioterio del Instituto Nacional de Salud.

8 RESULTADOS.

8.1 Los inhibidores de NF-kB reducen la infección de rotavirus en vellosidades aisladas de ratón adulto ICR.

Para observar los cambios en la expresión de NF-kB en vellosidades de ratón ICR infectadas con rotavirus ECwt y tratadas con inhibidores específicos de NF-kB como Curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato, se extrajeron vellosidades del intestino delgado de los ratones y se infectaron con el rotavirus ECwt (MOI de 0.8) activado con tripsina. Las vellosidades infectadas con rotavirus, se incubaron por ~1 h a 37°C. Luego se adicionó 10µM, 25µM, 50µM, 75µM y 100µM de cada inhibidor (curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato), posteriormente el cultivo se incubó por ~12 h a 37°C, con los respectivos controles, células sin infectar sin tratamiento y células infectadas sin tratamiento. Los experimentos se hicieron por duplicado y se repitieron tres veces. El resultado se evaluó por Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).

Con los tres inhibidores, la concentración que más redujo la detección del antígeno viral fue la de 100µM (Figura 6). Se presentaron reducciones del 74%, 54% y 84% para curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato respectivamente, en comparación con células infectadas (C.I.) que no recibieron inhibidores de la vía NF-kB. Estas diferencias son altamente significativas (Tabla 1). Teniendo en cuenta que la concentración de 100µM en los tres fármacos, presentó el más alto porcentaje de reducción de la infección por rotavirus en las vellosidades, fue la concentración que se utilizó para evaluar los inhibidores en posteriores ensayos.

Figura 6. Absorbancia de infección en las vellosidades infectadas tratadas con inhibidores específicos de NF-kB. Vellosidades infectadas con rotavirus y tratadas con inhibidores en diferentes concentraciones, cosechadas a las ~12 h.p.t. y revelados con anticuerpos policlonales contra rotavirus en Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).

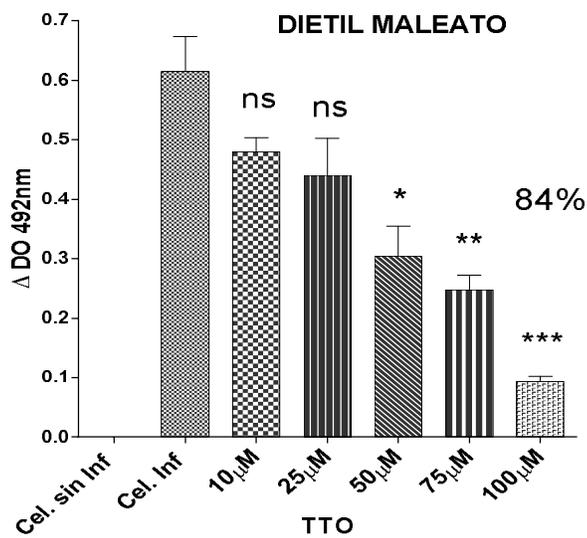
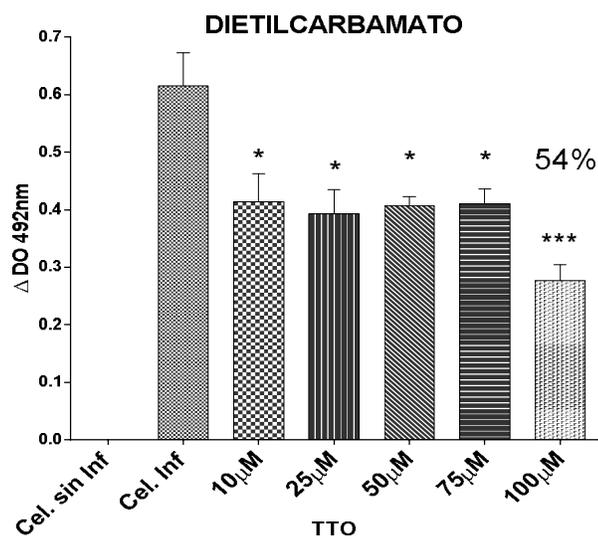
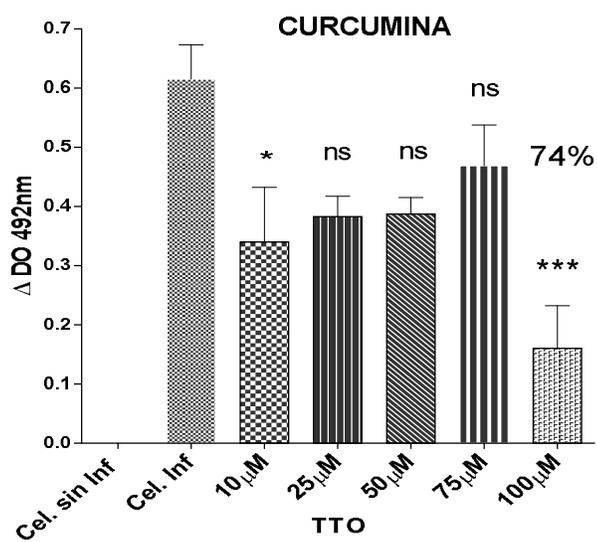


Tabla 1. Tratamiento estadístico para las concentraciones utilizadas para los tres inhibidores de NF- κ B. M representa la media aritmética, D la diferencia porcentual frente al control de células infectadas sin ningún tratamiento y S la significancia de esta diferencia. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces.

Células Infectadas (C.I.)			TRATAMIENTO									
			Concentraciones	Curcumina (Cur)			Dietil-Carbamato (DC)			Dietil-Maleato (DM)		
M	D (%)	S		M %	D (%)	S	M %	D (%)	S	M %	D (%)	S
0,615			10 μ M	0,340	44,77	*	0,414	32,61	*	0,480	22,00	ns
			25 μ M	0,383	37,78	ns	0,393	36,07	*	0,441	28,34	ns
			50 μ M	0,387	37,01	ns	0,408	33,71	*	0,304	50,51	*
			75 μ M	0,469	23,67	ns	0,411	33,22	*	0,248	59,70	**
			100 μ M	0,160	74,05	***	0,277	54,98	***	0,094	84,71	***

Se evaluó la citotoxicidad de los reactivos a la concentración de 100 μ M, mediante el reactivo Azul Tripan. Para esto, se aislaron las vellosidades, se aplicó cada inhibidor y se cultivaron por 12h a 37°C, sin infectar con rotavirus (Figura 7). A las 0 h. el porcentaje de viabilidad fue de 98,5% para las vellosidades sin tratamiento (control negativo), 96% en células tratadas con H₂O₂ (control positivo), 97%, 96,5%, 97% para curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato respectivamente (Tabla 2). Al evaluar la viabilidad luego de 12 h de cultivo con los inhibidores de la vía NF- κ B, no presentó una variación mayor al 2,1% para los tres fármacos y la reducción para todos los casos no fue estadísticamente significativa, en comparación con el tiempo 0 h. Las vellosidades tratadas con H₂O₂ (0,1 mM) luego de 12 h fue del 90% (Tabla 2), siendo altamente significativa respecto a 0 h.

Figura 7. Viabilidad de vellosidades aisladas determinada por el método de exclusión con Azul Tripan. Las vellosidades previamente aisladas fueron tratadas con los diferentes fármacos en la concentración de 100 μ M por 12 h a 37°C y posteriormente se adicionó el reactivo Azul Tripan en una dilución de 1:1 durante 1 minuto. Se usó como control negativo vellosidades sin ningún tratamiento y como control positivo vellosidades tratadas con H₂O₂ a 0,1mM.

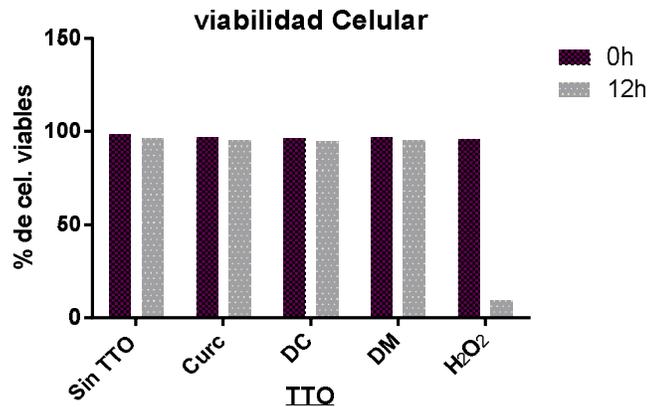


Tabla 2. Tratamiento estadístico de la Viabilidad de vellosidades aisladas determinada por el método de exclusión con Azul Tripan. M representa la media aritmética, SD La desviación estándar, D la diferencia porcentual comparando los valores a las 0 y 12 h.p.t. y S la significancia de los datos comparados en estos mismos tiempos. S se graficó de acuerdo a las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 2 veces.

TRATAMIENTO	% de células viables 0 h.		% de células viables 12 h.			
	M	SD	M	SD	D	S
Células sin tratamiento	98,5%	0,71	96,5 %	0,71	2,03 %	Ns
Células con H₂O₂ 0,1mM	96,0%	0,00	9,5%	0,71	90,1 %	***
Curcumina (Cur)	97,0%	0,00	95,5 %	0,71	1,55 %	Ns
Dietil-Carbamato (DC)	96,5%	0,71	94,5 %	0,71	2,07 %	ns
Dietil-Maleato (DM)	97,0%	1,41	95,5 %	0,71	1,55 %	ns

8.2 Inhibir la vía NF-kB reduce la producción de viriones (TLPs) en vellosidades aisladas de ratón ICR.

Para los inhibidores en este ensayo se utilizó una concentración de 100µM, se infectaron vellosidades con rotavirus ECwt (MOI de 0.8), se cultivaron a 37°C y se cosecharon cada

dos h (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h). Los inhibidores se aplicaron 1 h.p.i. La producción de antígenos virales se determinó mediante las técnicas de ELISA e inmunocitoquímica. Primero se evaluó la producción neta de antígenos virales totales. Es decir, proteínas del virus, mediante anticuerpos, sin discriminar si corresponden a proteínas independientes o conformando el virión completo ya ensamblado (TLP).

Al evaluar los antígenos cada dos h.p.i mediante la técnica de ELISA, se observó que los tres fármacos inhibidores de NF- κ B, mostraron un comportamiento similar en la reducción de la infección a medida que pasa el tiempo (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h) (Figura 8A). Hay diferencias significativas a partir de las 6 h.p.i., con un promedio de absorbancia para curcumina de 0,235; dietil-carbamato de 0,270; y dietil-maleato de 0,272 comparado con 0,303 del C.I. Al transformar la absorbancia en porcentaje se disminuye la infección en 22,6% para curcumina (muy significativo), 10,9% para dietil-carbamato (significativo) y 10,2% para dietil-maleato (significativo) (Tabla 3). Este comportamiento inhibitorio de infección, va aumentando a través del tiempo y presentan su punto más alto, al final del ensayo con absorbancias de 0,180 a las 10 h.p.i. para curcumina y de 0,231 y 0,260 a las 12 h.p.i., al tratar con los fármacos dietil-carbamato y dietil-maleato respectivamente, comparado con 0,403 del C.I. Al transformar la absorbancia en porcentaje se reduce el antígeno viral en un 50,1%(10 h) al tratar con curcumina, en un 42,7% (12 h) al tratar con dietil-carbamato; y en un 35,5%(12 h) al tratar con dietil-maleato, estadísticamente altamente significativo en los tres tratamientos (Tabla 3). En fotos representativas de inmunocitoquímica, también se observó disminución de la infección en comparación con el C.I. para cada uno de los inhibidores (Figura 8B).

Figura 8. Porcentaje de Infección en las vellosidades infectadas tratadas con Inhibidores de NF- κ B. Vellosidades infectadas con rotavirus y tratadas con inhibidores con concentración 100 μ M cosechadas a diferentes h.p.i. **A.** ELISA de captura utilizando anticuerpos anti-rotavirus y posteriormente se agregaron anticuerpos secundarios marcados con HRP. El sistema se reveló con OPD y fue evaluada su absorbancia a 490nm; como control positivo se usaron vellosidades infectadas en ausencia de tratamiento. **B.** fotografías representativas de inmunocitoquímica de la infección por rotavirus en vellosidades de ratón tratadas con inhibidores de NF- κ B. **C.** Vellosidades previamente aisladas, infectadas, tratadas y lisadas fueron agregadas a nuevas vellosidades y se incubaron a 37°C durante 12 horas, posteriormente se evaluaron mediante ELISA.

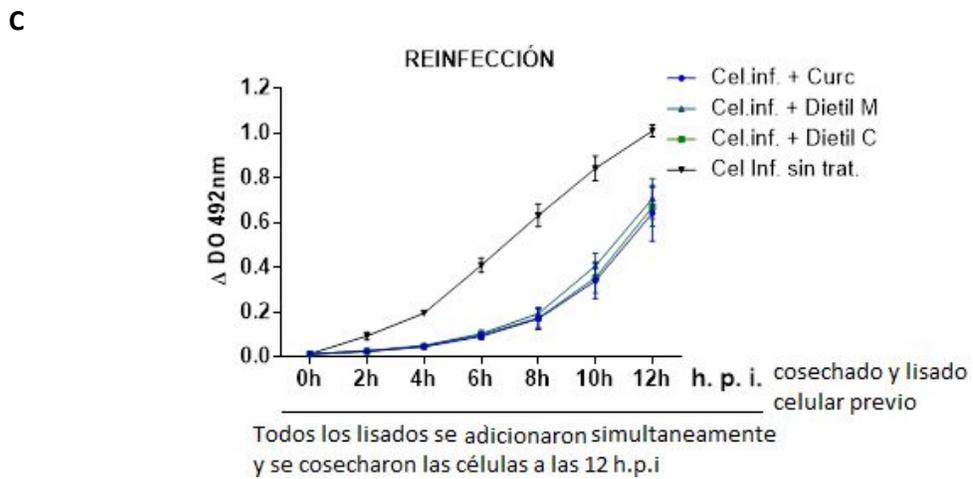
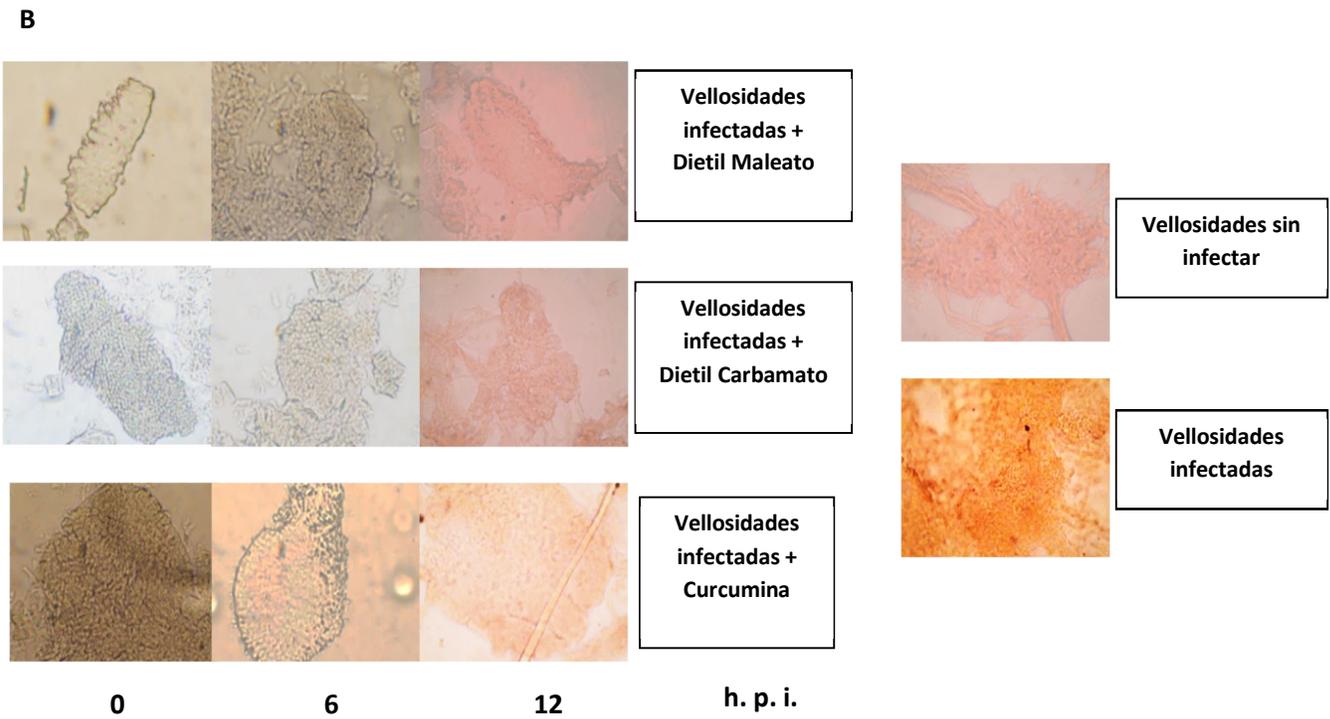
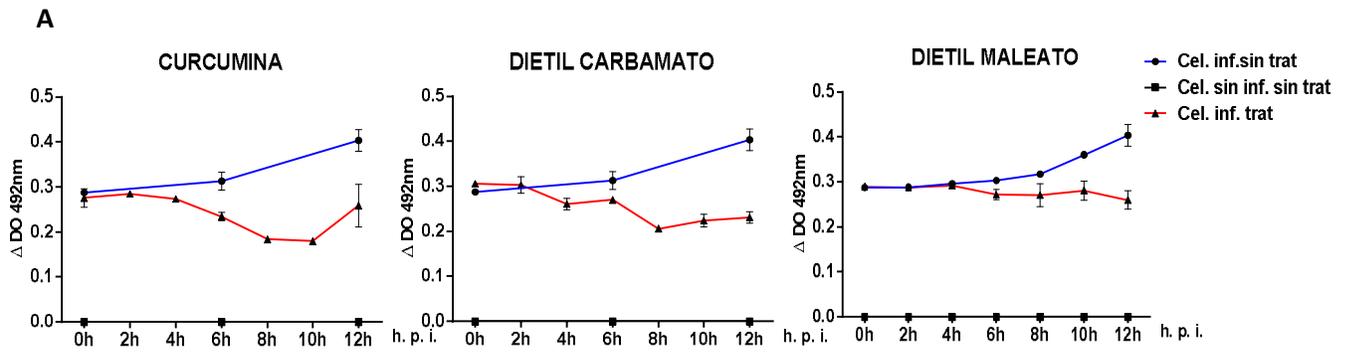


Tabla 3. Tratamiento estadístico (ELISA) para determinar la producción de antígenos virales de rotavirus en vellosidades infectadas y tratadas con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convencion: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces.

h. p. i	TRATAMIENTO													
	Células Infectadas (C.I.)		Curcumina (Cur)				Dietilditiocarbamato (DC)				Dietil Maleato (DM)			
	M	SD	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S
0	0,288	0,006	0,276	0,020	4,2	ns	0,306	0,003	6,4	ns	0,304	0,007	5,7	ns
2	0,288	0,001	0,285	0,004	1,2	ns	0,303	0,018	5,2	ns	0,295	0,004	2,3	ns
4	0,296	0,002	0,274	0,003	7,6	ns	0,261	0,012	12,0	ns	0,293	0,004	1,2	ns
6	0,303	0,005	0,235	0,009	22,6	**	0,270	0,001	10,9	*	0,272	0,011	10,2	*
8	0,318	0,003	0,184	0,005	42,0	***	0,206	0,003	35,1	***	0,271	0,026	14,8	***
10	0,360	0,007	0,180	0,006	50,1	***	0,249	0,021	30,8	***	0,281	0,021	21,9	***
12	0,403	0,024	0,259	0,047	35,9	***	0,231	0,013	42,7	***	0,260	0,021	35,5	***

Los anteriores resultados nos dan información sobre la presencia de antígeno viral, pero no da información acerca de si los inhibidores están teniendo algún efecto en el ensamblaje de nuevas partículas virales con capacidad infecciosa.

Con el fin de determinar si al inhibir la vía NF-kB se interfiere con el ensamblaje o se disminuye la síntesis de proteínas virales, sin afectar el ensamblaje, se realizó una re-infección. Para este caso, el supuesto es: si se está interfiriendo con el ensamblaje del virus no se observaría re-infección debido a que no se forman viriones (TLPs), aunque haya proteínas individuales en el interior de la vellosidad y el ELISA sea positivo. Si, por el contrario, se afecta la síntesis de proteínas virales, pero estas logran ensamblarse en viriones, al re-infectar se detectarían de nuevo los antígenos virales, puesto que solamente hay infección cuando hay viriones (TLPs). Para determinar esto, las vellosidades cosechadas a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h.p.i. y tratadas con los inhibidores de la vía NF-kB,

se congelaron y descongelaron tres veces, se hicieron diluciones del lisado viral y se re-infectaron nuevas vellosidades con estas diluciones. Todas las vellosidades se cosecharon a las 12 h.p.i. y se revelaron por ELISA con anticuerpos anti-rotavirus (Figura 8C).

Los resultados indican que los inhibidores disminuyeron la generación de viriones completos desde las 2 h.p.i. en comparación con el control de infección (C.I), con promedios de absorbancia para el C.I. de 0,147; para curcumina de 0,013; para Dietil-carbamato de 0,014 y Dietil-maleato de 0,013. Este promedio de absorbancia fue incrementando a través del tiempo, con la misma tendencia pero por debajo del C.I., pasando de 0,092 para curcumina, de 0,098 para dietil-carbamato y de 0,103 para dietil-maleato a las 6 h.p.t. hasta 0,642 para curcumina, 0,670 para dietil-carbamato y 0,707 para dietil-maleato a las 12 h.p.t. (Figura 8C). Analizando estos tratamientos estadísticamente en todas las h.p.i. 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12, siempre presentaron una diferencia altamente significativa al ser comparados con C.I. (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamiento estadístico del porcentaje para ELISA de antígenos virales en re-infección. SD La desviación estándar, D la diferencia porcentual comparada frente al control de células infectadas sin ningún tratamiento y S la significancia de esta diferencia. S se graficó de acuerdo a las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 2 veces

h. p. i	TRATAMIENTO															
	Células Infectadas (C.I.)				Curcumina (Cur)				Dietil-Carbamato (DC)				Dietil-Maleato (DM)			
	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S
2	0.195	0,001			0.025	0,002	87,2	***	0.026	0,003	86,7	***	0.026	0,003	86,7	***
4	0.271	0,002			0.046	0,004	83,0	***	0.047	0,005	82,7	***	0.051	0,004	81,2	***
6	0.409	0,005			0.092	0,014	77,6	***	0.098	0,014	76,0	***	0.103	0,016	74,8	***
8	0.633	0,003			0.171	0,048	73,0	***	0.174	0,042	72,5	***	0.193	0,027	69,4	***
10	0.842	0,007			0.340	0,079	59,7	***	0.354	0,070	58,0	***	0.406	0,057	51,8	***
12	0.992	0,024			0.642	0,124	35,2	***	0.670	0,087	32,4	***	0.707	0,089	28,7	***

8.3 La infección de vellosidades intestinales de ratones adultos ICR con rotavirus ECwt modifica la expresión de NF-kB.

El resultado de la expresión de la proteína se evaluó por inmunofluorescencia y Western Blot con Ac. anti-pNF-kB (p50, ser 337, la forma activa que se transloca al núcleo) (Figura 9A-C). Además, se observó fragmentación de ADN por medio de Hoechst a las 0 y 12 h.p.t.

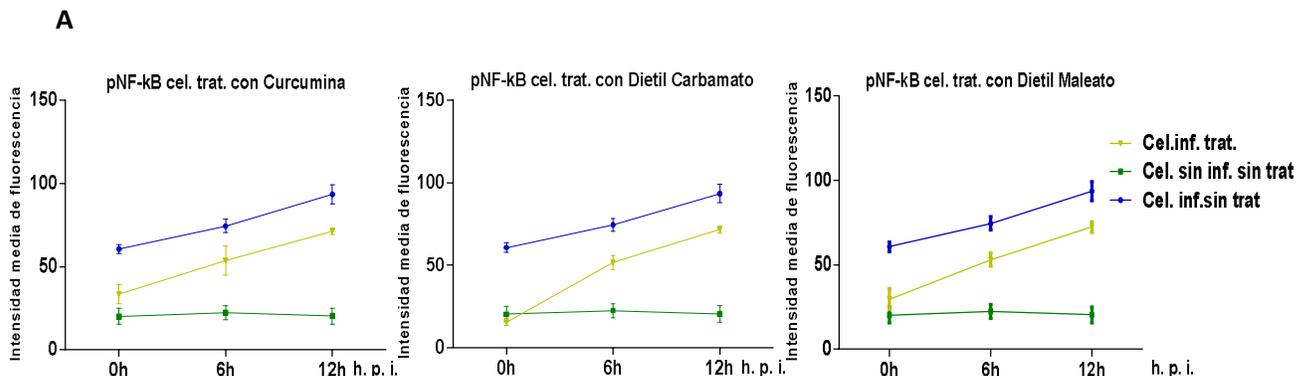
La proteína p50 de pNF-kB se analizó por inmunofluorescencia, tomando fotografías representativas en campo claro y fluorescente y analizando las fotografías mediante el programa ImageJ (plugins, cell counter) (Figura 9B). Este programa permite seleccionar el área de interés y sustraer el valor de la intensidad del fondo (background), para evitar errores en lectura debidos a la fluorescencia reflejada y los pixeles, que son transformados y expresados por el programa en una escala de 0 a 100, donde 0 representa ninguna fluorescencia y 100 la máxima intensidad. Estos resultados se expresaron como intensidad media de fluorescencia, tomando como control positivo la fluorescencia de células infectadas sin tratamiento (C.I.). Los resultados mostrados son por duplicado y del conteo de fotografías tomadas para cada tratamiento, en cada hora evaluada.

En el análisis por inmunofluorescencia a través del tiempo (0 h, 6 h y 12 h.) del antígeno de pNF-kB en vellosidades no infectadas (C.S.I.), infectadas (C.I.) e infectadas y tratadas con los tres inhibidores (Figura 9A). Se encontró una intensidad media de fluorescencia constante a través del tiempo en C.S.I. de 20,2 (0 h), 22,4 (6 h) y 20,3 (12 h). En células infectadas, la intensidad media de fluorescencia aumentó con valores de 60,6 (0 h), 74,4 (6 h) y 93,4 (12 h) (Tabla 5). La intensidad media de fluorescencia en las vellosidades tratadas con curcumina fue de 33,4 a las 0 h, 53,6 a las 6 h hasta 71,5 a las 12 h. Al transformar la intensidad media de fluorescencia en porcentajes se reduce a las 0 h un 44,9%, a las 6 h un 27,9% (altamente significativa) y a las 12 h un 23,5% (muy significativa) con respecto a C.I. Los tratamientos con dietil-carbamato presentaron porcentajes de reducción de la proteína con respecto a C.I. con variaciones altamente significativa a las 0 h (74,5%) y 6 h (30,5%) e intensidad media de fluorescencia de 15,4 y 51,7 respectivamente y muy significativa a las 12 h (23,3%) con intensidad media de fluorescencia de 71,7 (Figura 9A). Para el caso de dietil-maleato, se observó intensidad media de fluorescencia a las 0 h de

29,7; a las 6 h de 53,1 y de 72,4 a las 12 h. Al transformar la intensidad de fluorescencia en porcentajes a C.I. se reduce a las 0 h un 51,0% (altamente significativo), a las 6 h 28,7% (altamente significativo) y a las 12 h un 22,5% (muy significativa) (Tabla 5). La misma tendencia observada en la inmunofluorescencia, se obtuvo al analizar la expresión del antígeno pNF-kB, mediante la técnica de inmunocitoquímica: los inhibidores disminuyen la presencia de antígeno rotaviral a través del tiempo (0, 6 y 12 h), al tratar con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato (Figura 8B (B1)). (Tabla 5).

Otra técnica para evaluar la expresión de la proteína de pNF-kB fue por Western blot (Figura 9C). Las cantidades de proteína que se usaron para hacer el western blot se homogenizaron, realizando electroforesis previas. Se observa que a las 12 h.p.i. hay una banda evidente en las vellosidades infectadas y esta banda se disminuye cuando se adiciona los inhibidores de p50, utilizando el anticuerpo anti-pNF-kB. La técnica de revelado fue igual para toda la membrana y se detuvo el revelado una vez aparecieron las bandas en las células infectadas a las 12 h.p.i.

Figura 9. NF-kB modifica su expresión en vellosidades intestinales de ratones adultos ICR infectadas con rotavirus ECwt y tratadas con inhibidores. A. B. C. Vellosidades infectadas con rotavirus y tratadas con inhibidores en concentración 100 μ M cosechadas en diferentes h.p.t **A.** Revelados en inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales contra pNF-kB. **B.** fotos representativas Ag viral y pNF-kB, reveladas con inmunocitoquímica con Ac. anti-rotavirus de vellosidades sin infectar, infectadas e infectadas y tratadas (B1), fotos representativas técnica de inmunofluorescencia con Ac. Anti-pNF-kB en vellosidades cosechadas a diferentes h.p.t. 0, 6 y 12 (B2), fotos representativas analizadas con Hoechst para observar fragmentación de ADN. **C.** Western Blot con anticuerpos policlonales contra pNF-kB.



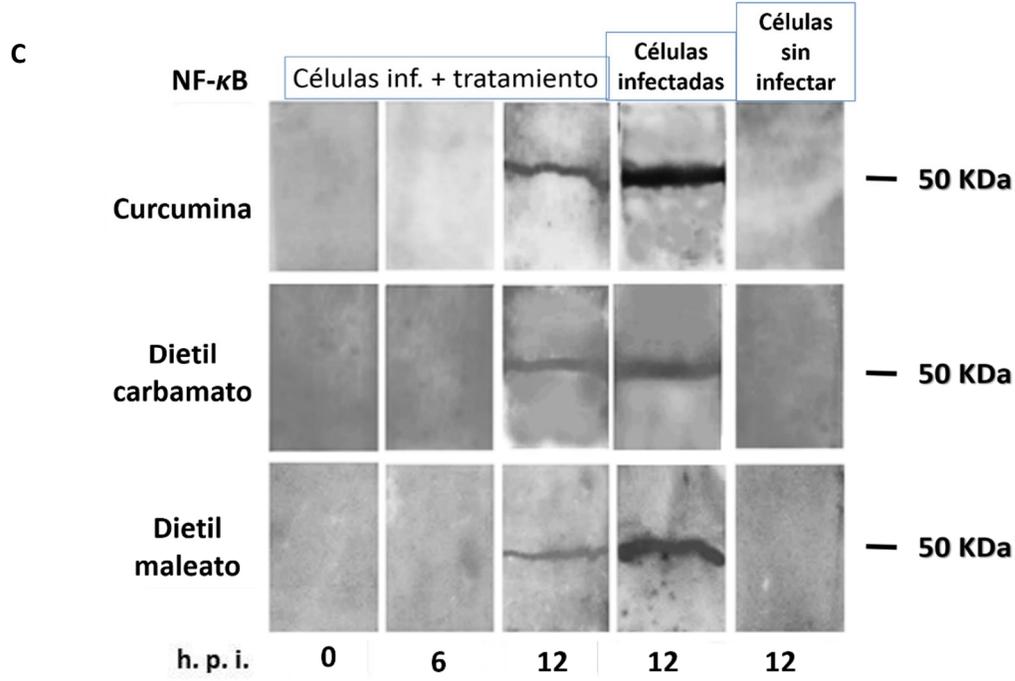
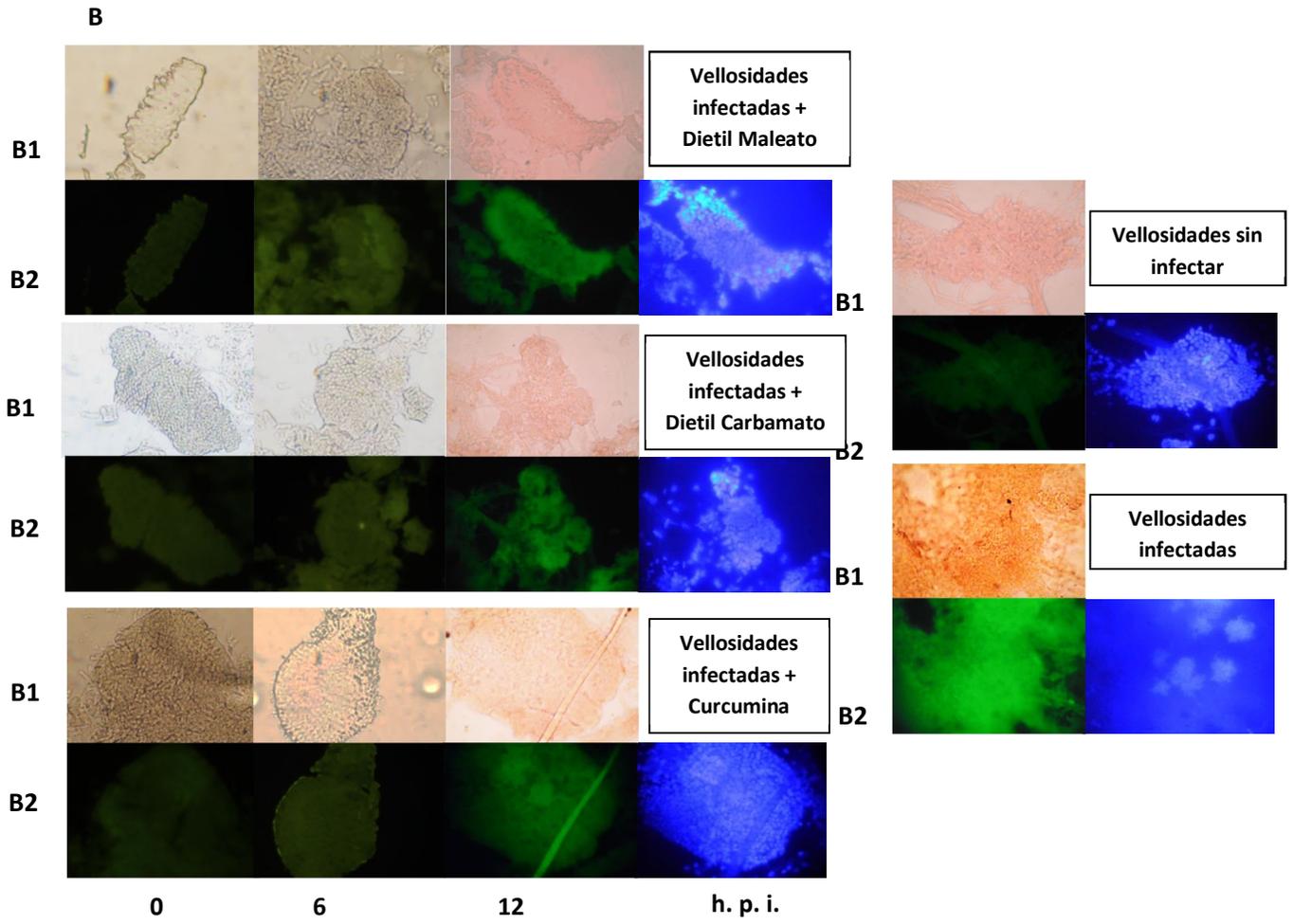


Tabla 5. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para pNF-kB. M representa la media aritmética, SD La desviación estándar, D, D la diferencia porcentual frente al control de células infectadas sin ningún tratamiento y S la significancia de esta diferencia. S se graficó de acuerdo a las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces

TRATAMIENTOS	h.p.i	Intensidad media de fluorescencia NF-kB			
		M	SD	D (%)	S
Células Infectadas (C.I.)	0	60,6	2,82		
	6	74,4	4,00		
	12	93,4	5,61		
Células sin Infectar (C.S.I.)	0	20,2	4,74	66,6	***
	6	22,4	4,28	69,9	***
	12	20,3	4,85	78,2	***
Curcumina (Cur)	0	33,4	5,86	44,9	***
	6	53,6	8,83	27,9	***
	12	71,5	1,85	23,5	**
Dietil-Carbamato (DC)	0	15,4	2,16	74,5	***
	6	51,7	4,27	30,5	***
	12	71,7	2,09	23,3	**
Dietil-Maleato (DM)	0	29,7	6,01	51,0	***
	6	53,1	3,92	28,7	***
	12	72,4	3,18	22,5	**

8.4 Aplicando inhibidores de NF-kB, antes o después de la infección, se disminuye la detección de antígenos virales.

Se analizó si los inhibidores de NF-kB tienen efecto similar o diferente al utilizarlos antes (AI) o después (DI) de infectar con rotavirus, Para este ensayo, se utilizó la concentración de 100µM para los inhibidores, se infectaron vellosidades con rotavirus ECwt (MOI de 0.8) y se cultivaron a 37°C durante 12h. En un ensayo, las vellosidades aisladas se infectaron por 1 h a 37°C y se aplicaron los inhibidores de la vía NF-kB. En el otro ensayo, las vellosidades fueron primero tratadas con los inhibidores por ~1 h a 37°C y luego infectadas con rotavirus. Los dos tratamientos fueron hechos por duplicado e incubados a 37°C y

cosechados a diferentes h.p.i. (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12h) con los respectivos controles y analizadas por las técnicas de ELISA (Figura 10A) e inmunofluorescencia (Figura 10B). Para determinar el aumento o disminución en la expresión de la proteína pNF-kB por inmunofluorescencia, se realizó un conteo de la intensidad media de fluorescencia sobre las láminas, con ayuda del programa ImageJ.

En el análisis del antígeno viral por la técnica de ELISA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, en las curvas del antígeno rotaviral cotejado AI y DI de los tratamientos con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato a las diferentes h.p.t. (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12h) (Figura 10A). En tiempo 0, la absorbancia antes (AI) o después (DI) de la infección fue de 0,276 (AI) - 0,276 (DI), para curcumina; 0,291 (AI) - 0,286 (DI) para dietil-carbamato; y 0,289 (AI) - 0,281 (DI) para dietil-maleato (Tablas 6 - 8). En células infectadas sin tratamiento, en tiempo 0, la absorbancia fue de 0,288. La reducción más significativa fue a las 10 h.p.t con absorbancia de 0,211 (AI) y 0,180 (DI), al tratar con curcumina. Al convertir la absorbancia a porcentaje equivale a una disminución del 41,5% y 50,1% respectivamente, al comparar con 0,360 de absorbancia de las células infectadas (C.I) sin tratamiento con los inhibidores de la vía NF-kB. (Tabla 6); estadísticamente es muy significativo en los dos casos.

A las 12 h.p.t para el fármaco dietil-carbamato, la absorbancia fue de 0,231 DI y 0,259 AI y en las vellosidades infectadas sin tratamiento la absorbancia fue de 0,360. Al transformar la absorbancia a porcentajes equivale a una reducción de 42,7% DI y 35,9% AI, siendo estadísticamente muy significativo en los dos casos (Tabla 7). En el caso de dietil-maleato en relación al tiempo y mayor reducción en antígenos virales fue a las 12 h, 0,260 DI y 0,276 AI. Al transformarlo a porcentaje hay una disminución de 35,5% - 31,6%, muy significativo estadísticamente comparado con C.I. (Tabla 8).

Tabla 6. Tratamiento estadístico (ELISA) para determinar la producción de antígenos virales de rotavirus en vellosidades infectadas y tratadas con curcumina AI y DI. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces.

h. p. i	TRATAMIENTO												
	Células Infectadas (C.I.)				Curcumina después de infectar (Cur DI)				Curcumina antes de infectar (Cur AI)				Cur DI/AI
	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	S
0	0,288	0,006			0,276	0,020	4,2	ns	0,276	0,007	4,2	ns	ns
2	0,288	0,001			0,285	0,004	1,2	ns	0,275	0,006	4,7	ns	ns
4	0,296	0,002			0,274	0,003	7,6	ns	0,260	0,014	12,2	ns	ns
6	0,303	0,005			0,235	0,009	22,6	**	0,232	0,002	23,6	**	ns
8	0,318	0,003			0,184	0,005	42,0	***	0,219	0,016	31,2	***	ns
10	0,360	0,007			0,180	0,006	50,1	***	0,211	0,019	41,5	***	ns
12	0,403	0,024			0,259	0,047	35,9	***	0,257	0,005	36,2	***	ns

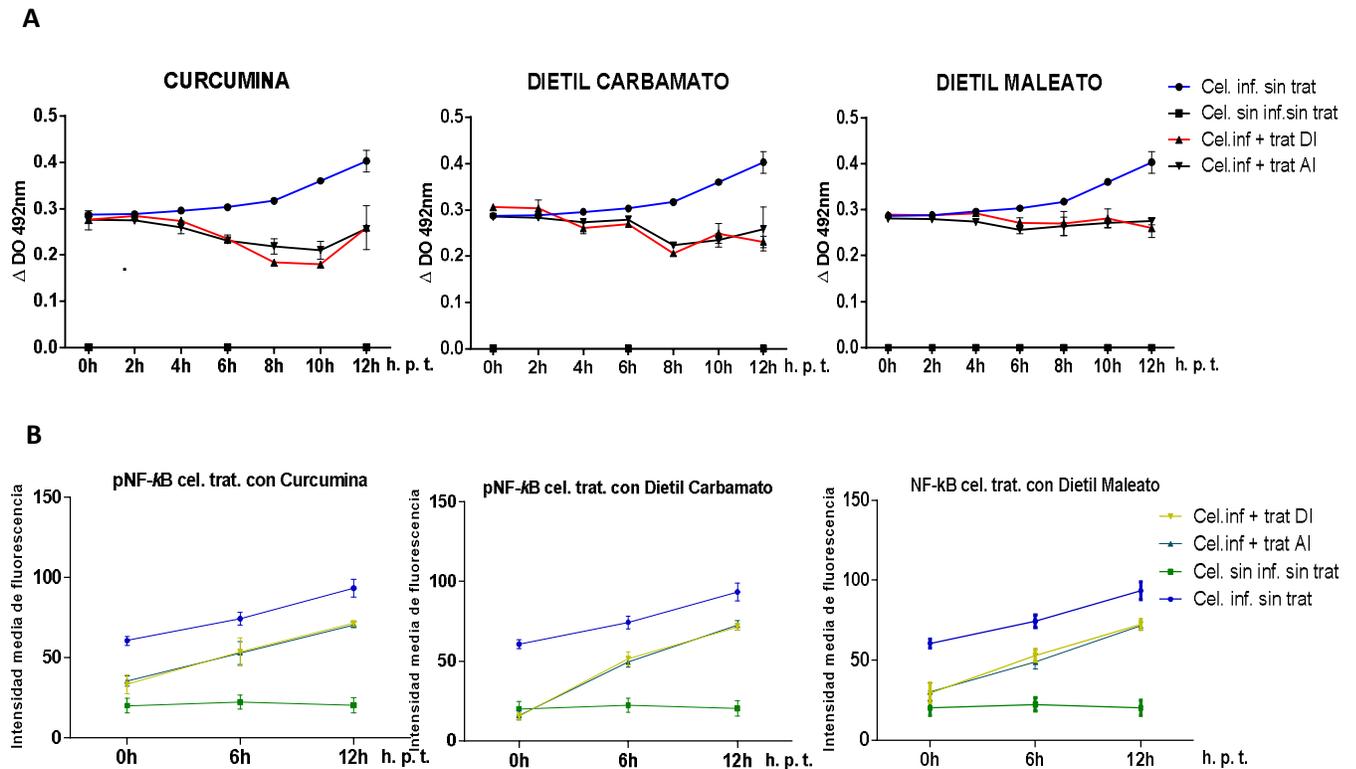
Tabla 7. Tratamiento estadístico (ELISA) para determinar la producción de antígenos virales de rotavirus en vellosidades infectadas y tratadas con dietil-carbamato AI y DI. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= $P > 0.05$ (no significativo); * = $P < 0.05$ (significativo); ** = $P < 0.01$ (muy significativo); *** = $P < 0.001$ (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces.

h. p. i	TRATAMIENTO												
	Células Infectadas (C.I.)				Dietil-carbamato después de infectar (DC DI)				Dietil-carbamato antes de infectar (DC AI)				DC DI/AI
	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	S
0	0,288	0,006			0,291	0,003	1,2	ns	0,286	0,006	0,7	ns	ns
2	0,288	0,001			0,283	0,018	1,7	ns	0,284	0,006	1,6	ns	ns
4	0,296	0,002			0,261	0,012	12,0	ns	0,274	0,004	7,6	ns	ns
6	0,303	0,005			0,270	0,001	10,9	*	0,280	0,002	7,8	ns	ns
8	0,318	0,003			0,206	0,003	35,1	***	0,224	0,006	29,6	***	ns
10	0,360	0,007			0,249	0,021	30,8	***	0,235	0,015	34,9	***	ns
12	0,403	0,024			0,231	0,013	42,7	***	0,259	0,047	35,9	***	ns

Tabla 8. Tratamiento estadístico (ELISA) para determinar la producción de antígenos virales de rotavirus en vellosidades infectadas y tratadas con dietil- maleato AI y DI. La significancia se graficó de acuerdo con las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces.

h. p. i	TRATAMIENTO												
	Células Infectadas (C.I.)				Dietil Maleato después de infectar (DM DI)				Dietil Maleato antes de infectar (DM AI)				DM DI/AI
	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	M	SD	D (%)	S	S
0	0,288	0,006			0,289	0,007	0,7	ns	0,281	0,008	2,4	ns	ns
2	0,288	0,001			0,288	0,004	0,0	ns	0,280	0,006	3,0	ns	ns
4	0,296	0,002			0,293	0,004	1,2	ns	0,260	0,014	7,4	ns	ns
6	0,303	0,005			0,272	0,011	10,2	*	0,227	0,005	15,3	ns	ns
8	0,318	0,003			0,271	0,026	14,8	***	0,240	0,014	16,9	***	ns
10	0,360	0,007			0,281	0,021	21,9	***	0,271	0,010	24,7	***	ns
12	0,403	0,024			0,260	0,021	35,5	***	0,276	0,008	31,6	***	ns

Figura 10. Los inhibidores de NF-kB afectan de manera similar cuando se adicionan antes y después de infectar con rotavirus. Vellosidades de ratones inoculadas con rotavirus ECwt por 1 h a 37°C, después se distribuyó la solución de vellosidades-virus en placa de 96 pozos, y se realizaron tratamientos con 100µM de cada inhibidor por duplicado, otras vellosidades fueron primero inoculadas con los inhibidores durante 1 h a 37°C y luego infectadas con el rotavirus. Los dos tratamientos fueron incubando a 37°C y cosechados a diferentes h.p.t. con los respectivos controles. **A.** análisis de antígeno rotaviral con Ac. anti-rotavirus por ELISA AI y DI. **B.** Análisis del a proteína NF-kB en con Ac. anti-pNF-kB por inmunofluorescencia en vellosidades AI y DI.



La expresión de la proteína pNF-kB AI y DI, también se evaluó por inmunofluorescencia, siguiendo los parámetros anteriormente mencionados para esta técnica y evaluando la intensidad de fluorescencia. Al tratar las vellosidades con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato previamente a la infección, se observó una disminución en la intensidad media de fluorescencia en cada una de las h.p.t. (0, 6 y 12 h), con respecto a C.I. sin tratamiento (Figura 10B). Los valores de intensidad media de fluorescencia obtenidos en vellosidades no infectadas fueron de 20,2 (0h), 22,4 (6h) y 20,3 (12h) (Tabla 9).

Con los inhibidores de la vía NF-kB todos presentando reducción de expresión de pNF-kB. Los porcentajes a las 0 y 6 h.p.t con curcumina fueron en un 41,6% y 28,7% (6 h), con dietil-carbamato de 73,7% (0 h), 33,5% (6 h) y al usar dietil-maleato fueron de 50,0% (0 h), 34,1% (6 h) todos con diferencias estadísticamente muy significativas al comparar con C.I. sin tratamiento. A las 12 h para los tres fármacos presentaron diferencias significativas con

23,5% al usar curcumina, de 22,4% con dietil-carbamato y de 23,5% con dietil-maleato, respecto a C.I. sin tratamiento (Tabla 9). Significancia similar se obtuvieron al infectar las vellosidades y posteriormente al tratar con los tres inhibidores al paso del tiempo (0, 6 y 12 h.p.t.). Una variación estadísticamente muy significativa para los tres inhibidores a las 0 y 6 h.p.t. y significativa a las 12 h.p.t. ver tabla 9.

Tabla 9. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para pNF-kB AI y DI. M representa la media aritmética, SD La desviación estándar, D la diferencia porcentual frente al control de células infectadas sin ningún tratamiento y S la significancia de esta diferencia. S se graficó de acuerdo a las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P<0.001 (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces.

TRATAMIENTOS	h.p.i		Intensidad media de fluorescencia NF-kB					TRATAMIENTOS	h.p.i		Intensidad media de fluorescencia NF-kB				
			M	SD	D (%)	S	AI/DI S				M	SD	D (%)	S	AI/DI S
Células Infectadas (C.I.)	0		60,6	2,82			Dietil-Carbamato (DC)	0	AI	15,9	2,71	73,7	***	ns	
	6		74,4	4,00		DI			15,4	2,16	74,5	***			
	12		93,4	5,61				6	AI	49,5	3,21	33,5	***	ns	
Células sin Infectar (C.S.I.)	0		20,2	4,74	66,6	***			DI	51,7	4,27	30,5	***		
	6		22,4	4,28	69,9	***		12	AI	72,5	3,13	22,4	**	ns	
	12		20,3	4,85	78,2	***			DI	71,7	2,09	23,3	**		
Curcumina (Cur)	0	AI	35,4	3,25	41,6	***	Dietil-Maleato (DM)	0	AI	30,3	5,51	50,0	***	ns	
		DI	33,4	5,86	44,9	***			DI	29,7	6,01	51,0	***		
	6	AI	53,1	7,10	28,7	***		6	AI	49,0	4,60	34,1	***	ns	
		DI	53,6	8,83	27,9	***			DI	53,1	3,92	28,7	***		
	12	AI	70,6	1,73	24,4	**		12	AI	71,4	2,59	23,5	**	ns	
		DI	71,5	1,85	23,5	**			DI	72,4	3,18	22,5	**		

8.4.1 Los inhibidores específicos de NF-kB en vellosidades intestinales de ratón ICR alteran la expresión de la proteína PPAR γ .

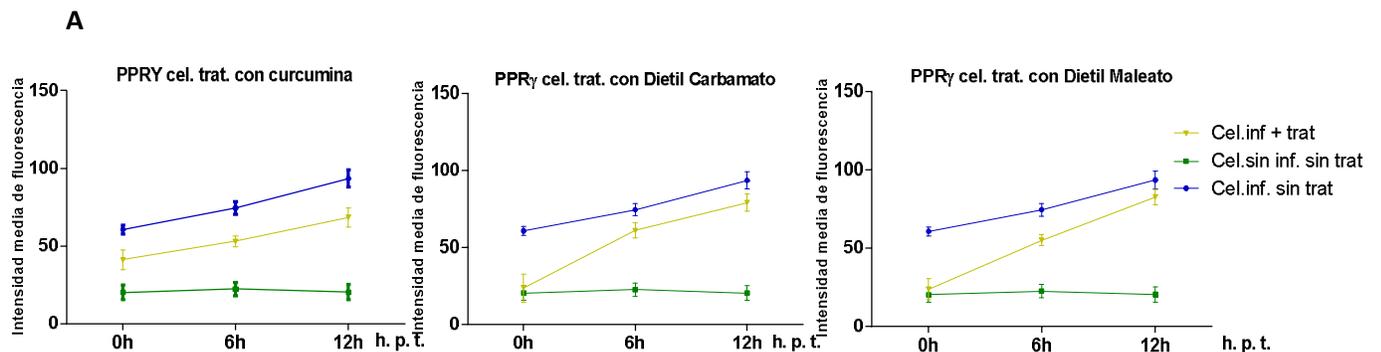
Para determinar si al inhibir pNF-kB con curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato en vellosidades de ratón, altera la expresión de proteínas celulares relacionadas con NF-kB, se evaluó mediante las técnicas de inmunofluorescencia y Western Blot las proteínas celulares PPAR γ y COX-2. No se observaron diferencias significativas al analizar AI o DI. Por lo tanto, se optó por analizar las proteínas PPAR γ y COX-2 solamente cuando se infecta primero y luego se trata con los inhibidores (Figura 11,12).

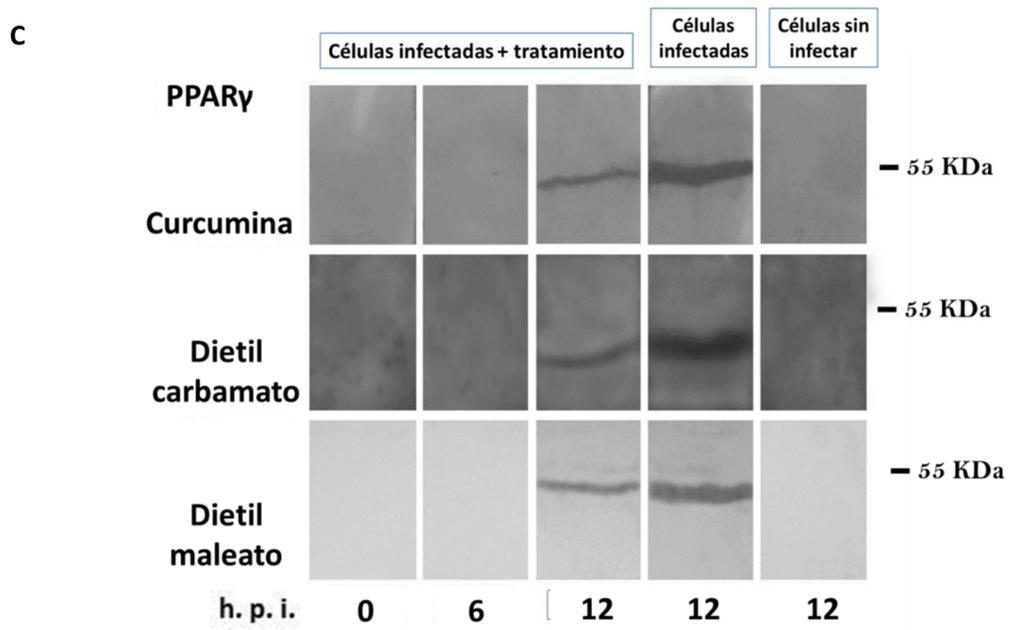
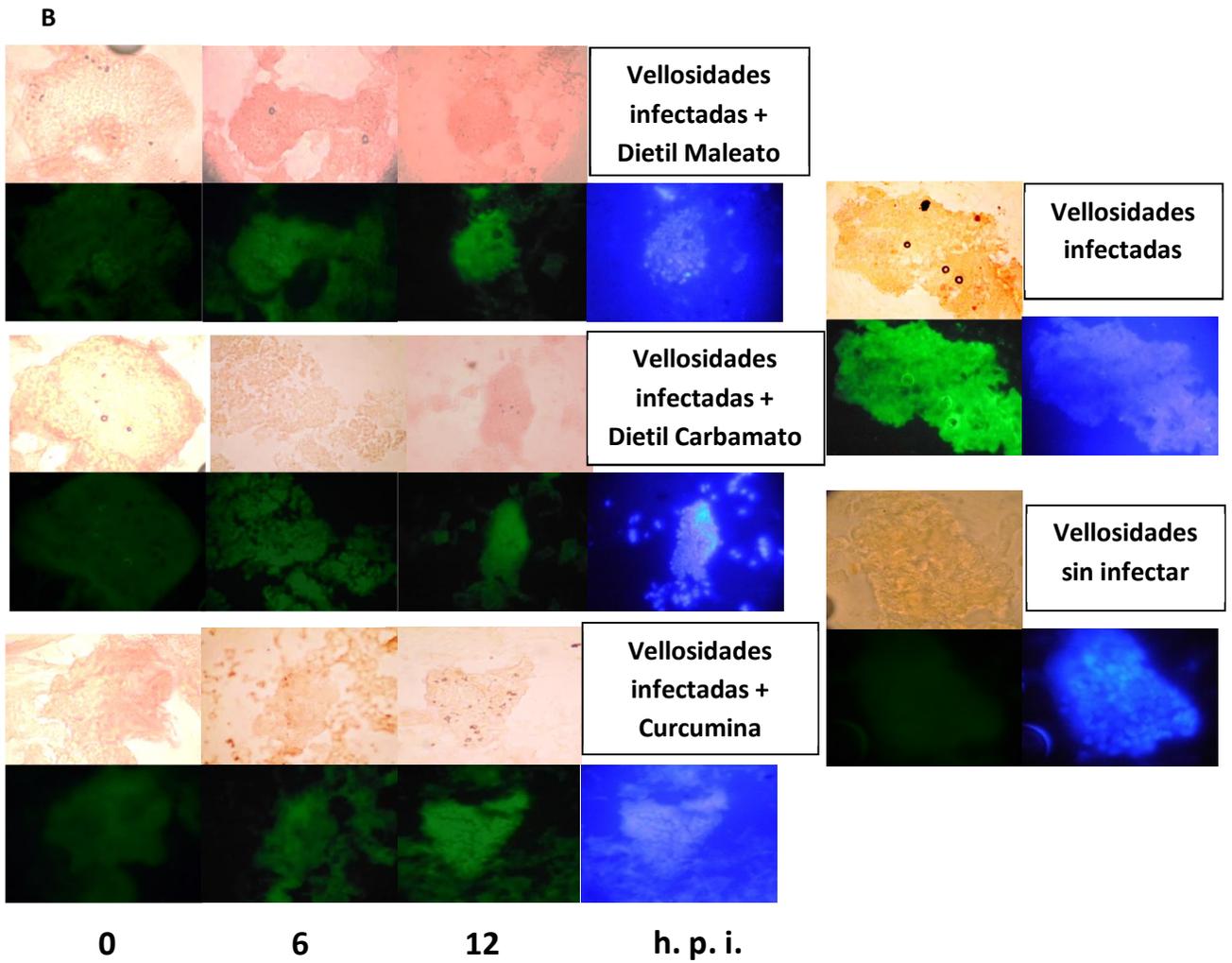
PPAR γ regula la respuesta inflamatoria, interfiriendo con la translocación al núcleo de NF-kB [18]. Para su análisis se realizó la técnica de Inmunofluorescencia y Western Blot según los parámetros descritos con anterioridad para estas técnicas (Figura 11 A, C). Los resultados en Inmunofluorescencia se reportaron como intensidad media de fluorescencia (Figura 11 A). Para el conteo se evaluaron 10 fotografías representativas para cada tratamiento, en las diferentes concentraciones mediante el programa ImageJ, usando como control negativo vellosidades que no habían sido infectadas, ni tratadas (C.S.I.) y como control positivo vellosidades infectadas sin tratamiento (C.I.) (Figura 11B).

El C.S.I. presentó una expresión basal similar en las diferentes horas evaluadas (20,2 a las 0 h, 22,4 a 6 h y 20,3 a las 12 h) y este valor aumentó de manera altamente significativa cuando las células se infectaron (Figura 11A) en un 66,6%, con una intensidad media de fluorescencia de 60,6 a las 0 h.p.t., incrementado a medida que pasó el tiempo hasta 78,2% (intensidad media 93,4) a las 12 h.p.t. (Tabla 10). El tratamiento con curcumina presentó valores de 41,2 a las 0 h.p.t., 53,1 a las 6 h.p.t. y 68,4 a las 12 h.p.t., con diferencias muy significativas de 32,0%, 28,7% a las 0 y 6 h.p.t. y significativas a las 12 h.p.t. de 26,8%, al compararse con C.I. Al tratar las vellosidades con dietil-carbamato se observaron valores de intensidad media a las 0, 6 y 12 h.p.t. de 23,6, 60,9 y 79,0, con diferencias estadísticamente muy significativas de 61,1% (0h), altamente significativa de 18,1% (6h) y significativa de 15,5% (12h) comparados con C.I. Para dietil-maleato se obtuvieron tendencias similares en variación a dietil-carbamato, con valores en fluorescencia a las 0, 6 y 12 h.p.t. de 23,7, 54,9 y 82,6 y reducciones de 60,9% (muy significativas), 26,2%

(altamente significativa) y 11,6%, (significativa) respectivamente comparados con C.I. (Tabla 10). Por otro lado, al comparar las fotos representativas de inmunocitoquímica se observó la disminución de la infección en comparación con el C.I. para cada uno de los inhibidores (Figura 12B).

Figura 11. PPAR γ modifica su expresión al tratar con inhibidores de NF-kB las vellosidades de ratón ICR infectadas con rotavirus. Vellosidades de ratones inoculadas con rotavirus ECwt por 1 h a 37°C, después se distribuyó la solución de vellosidades-virus en en placa de 96 pozos, y se realizaron tratamientos con 100 μ M de cada inhibidor por duplicado, Los tratamientos fueron incubados a 37°C y cosechados a diferentes h.p.t. con los respectivos controles. **A.** Análisis de la expresión de la proteína PPAR γ con Ac. anti-PPAR γ por inmunofluorescencia en vellosidades de ratón ICR. Tratadas con inhibidores de NF-kB **B.** Fotos representativas reveladas con inmunocitoquímica con Ac. anti-rotavirus de vellosidades sin infectar, infectadas e infectadas y tratadas, fotos representativas técnica de inmunofluorescencia con Ac. anti- PPAR γ en vellosidades cosechadas a diferentes h.p.t. 0, 6 y 12, fotos representativas analizadas con Hoechst para observar fragmentación de ADN. **C.** Resultados analizados con Western Blot con anticuerpos policlonales contra anti-PPAR γ .





Otra técnica para evaluar la expresión de la proteína de PPAR γ fue por Western blot (Figura 11C). Las cantidades de proteína que se usaron para hacer el western blot se homogenizaron realizando electroforesis previas. Se observó que a las 12 h.p.i., hay una banda evidente en las vellosidades infectadas y esta banda se disminuye cuando se adiciona los inhibidores de NF-kB, utilizando el anticuerpo anti PPAR γ . La técnica de revelado fue igual para toda la membrana y se paró el revelado, una vez aparecieron las bandas en las células infectadas a las 12 h.p.i.

Tabla 10. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para PPAR γ . M representa la media aritmética, SD La desviación estándar, D la diferencia porcentual frente al control de células infectadas sin ningún tratamiento y S la significancia de esta diferencia. S se graficó de acuerdo a las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces.

TRATAMIENTOS	h.p.i	Intensidad media de fluorescencia PPAR γ			
		M	SD	D (%)	S
Células Infectadas (C.I.)	0	60,6	2,82		
	6	74,4	4,00		
	12	93,4	5,61		
Células sin Infectar (C.S.I.)	0	20,2	4,74	66,6	***
	6	22,4	4,28	69,9	***
	12	20,3	4,85	78,2	***
Curcumina (Cur)	0	41,2	6,26	32,0	***
	6	53,1	3,58	28,7	***
	12	68,4	6,25	26,8	**
Dietil-Carbamato (DC)	0	23,6	9,14	61,1	***
	6	60,9	4,96	18,1	**
	12	79,0	5,47	15,5	*
Dietil-Maleato (DM)	0	23,7	6,61	60,9	***
	6	54,9	3,35	26,2	**
	12	82,6	4,91	11,6	*

8.4.2 Los inhibidores específicos de NF- κ B en vellosidades intestinales de ratón ICR alteran la expresión de la proteína COX-2.

Se ha encontrado que NF- κ B interfiere en la infección causada por rotavirus, mediante la regulación de factores necesarios para la infección como la proteína COX-2 [118]. Por tal motivo, se evaluó la variación en la expresión de esta proteína en vellosidades aisladas e infectadas con rotavirus y en vellosidades infectadas y posteriormente tratadas a diferentes h.p.t. (0, 6 y 12), usando las técnicas de Inmunofluorescencia y Western Blot, según los parámetros descrito con anterioridad para estas técnicas. Los resultados para la inmunofluorescencia se reportaron como intensidad media de fluorescencia (Figura 12A), a partir del conteo de 10 fotografías representativas, mediante el programa ImageJ (Figura 12B).

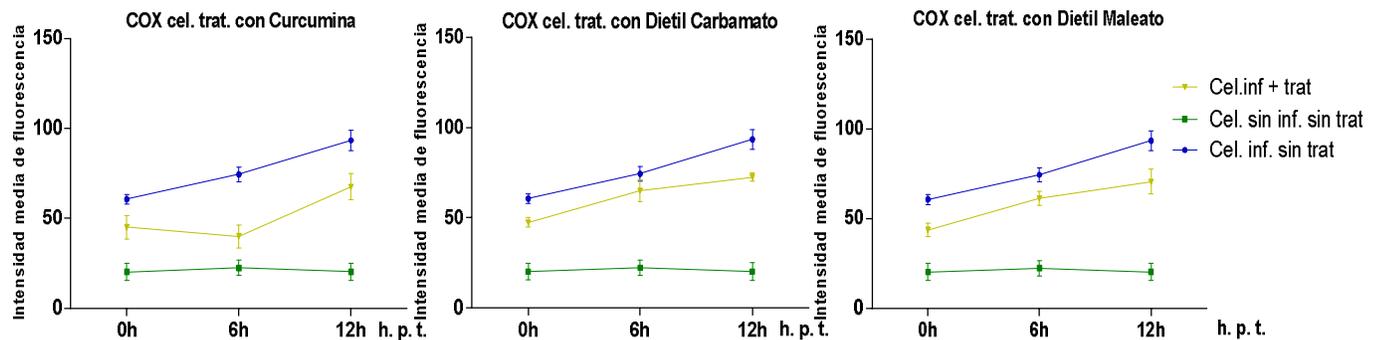
La medición de la intensidad media de fluorescencia, que expresaba la proteína COX-2 a las 0, 6 y 12 h.p.t. para C.S.I., fue de 20,2, 22,4 y 20,3 respectivamente y este valor aumentó en 60,6 (0h), 74,4 (6h) y 93,4 (12) cuando las vellosidades fueron infectadas, presentando diferencias muy significativas de 66,6%, 69,9% y 78,2% respectivamente (Figura 12A). La intensidad media de fluorescencia con curcumina fue 45,1 (0h), 40,0 (6h) y 67,6 (12h) con porcentajes de disminución a las 0 h.p.t. de 25,6% (altamente significativo), a las 6 h.p.t. de 46,2% (muy significativo) y a las 12 h.p.t. de 27,7% (altamente significativo), todo con respecto a C.I. El inhibidor de NF- κ B dietil-carbamato, presentó valores de intensidad media a las 0, 6, 12 h.p.t. de 47,5, 65,0 y 72,6, con disminución respecto al C.I. de 21,7%, 12,6% y 22,3% correspondientemente, siendo el primero y último estadísticamente muy significativos, mientras que a las 6 h.p.t. presentó cambios significativos. Al tratar las vellosidades con dietil-maleato se obtuvieron valores a las 0 h.p.t. de 43,6 con disminución en la expresión de la proteína muy significativa de 28,0%; a las 6 h.p.t. el incremento de intensidad media de fluorescencia fue de 61,3 con reducción estadísticamente significativo de 17,6% y a las 12 h.p.t. con valor de 70,6 de intensidad media con diferencias altamente significativas de 24,5%, todos comparados con C.I. (Tabla 11).

Otra técnica para evaluar la expresión de la proteína de COX-2 fue por Western blot (Figura 12C). Se observa que a las 12 h.p.i. hay una banda evidente en las vellosidades infectadas

y esta banda se disminuye cuando se adicionan los inhibidores de NF- κ B, utilizando el anticuerpo anti-COX2.

Figura 12. La proteína COX-2 modifica su expresión al tratar con inhibidores de NF- κ B las vellosidades de ratón ICR infectadas con rotavirus. Vellosidades de ratones inoculadas con rotavirus ECwt por 1 h a 37°C, después se distribuyó la solución de vellosidades-virus en en placa de 96 pozos, y se realizaron tratamientos con 100 μ M de cada inhibidor por duplicado, Los tratamientos fueron incubados a 37°C y cosechados a diferentes h.p.t. con los respectivos controles. A. Análisis de la expresión de la proteína COX-2 con Ac. anti-COX-2 por inmunofluorescencia en vellosidades de ratón ICR. Tratadas con inhibidores de NF- κ B B. Fotos representativas reveladas con inmunocitoquímica con Ac. anti-rotavirus de vellosidades sin infectar, infectadas e infectadas y tratadas, fotos representativas técnica de inmunofluorescencia con Ac. anti-COX-2 en vellosidades cosechadas a diferentes h.p.t. 0, 6 y 12, fotos representativas analizadas con Hoechst para observar fragmentación de ADN. C. Resultados analizados con Western Blot con anticuerpos policlonales contra anti-COX-2.

A



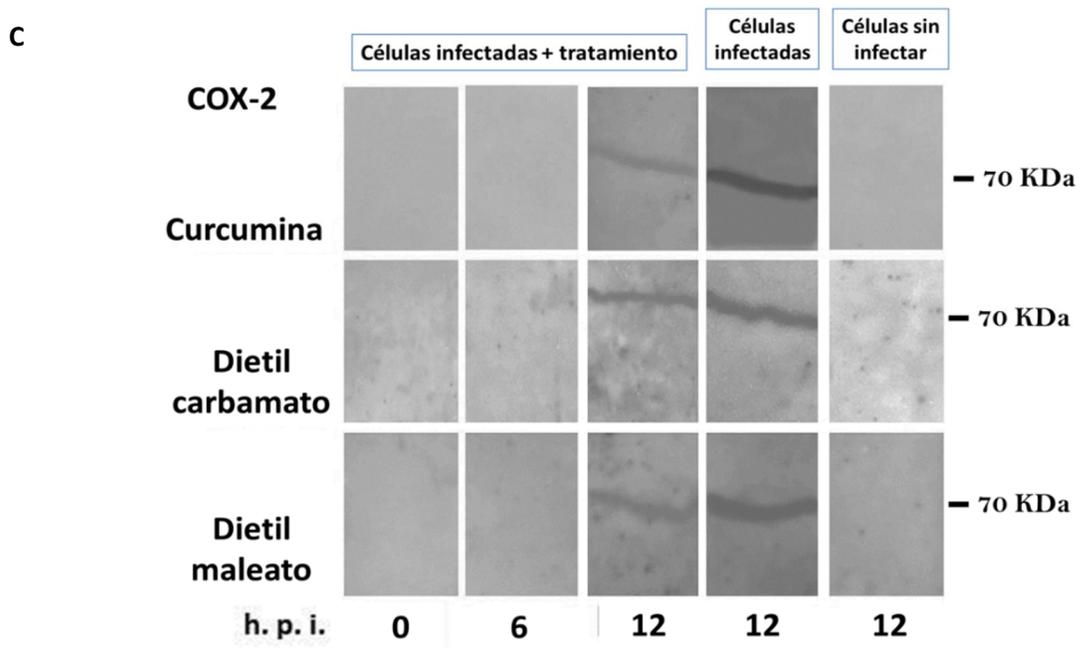
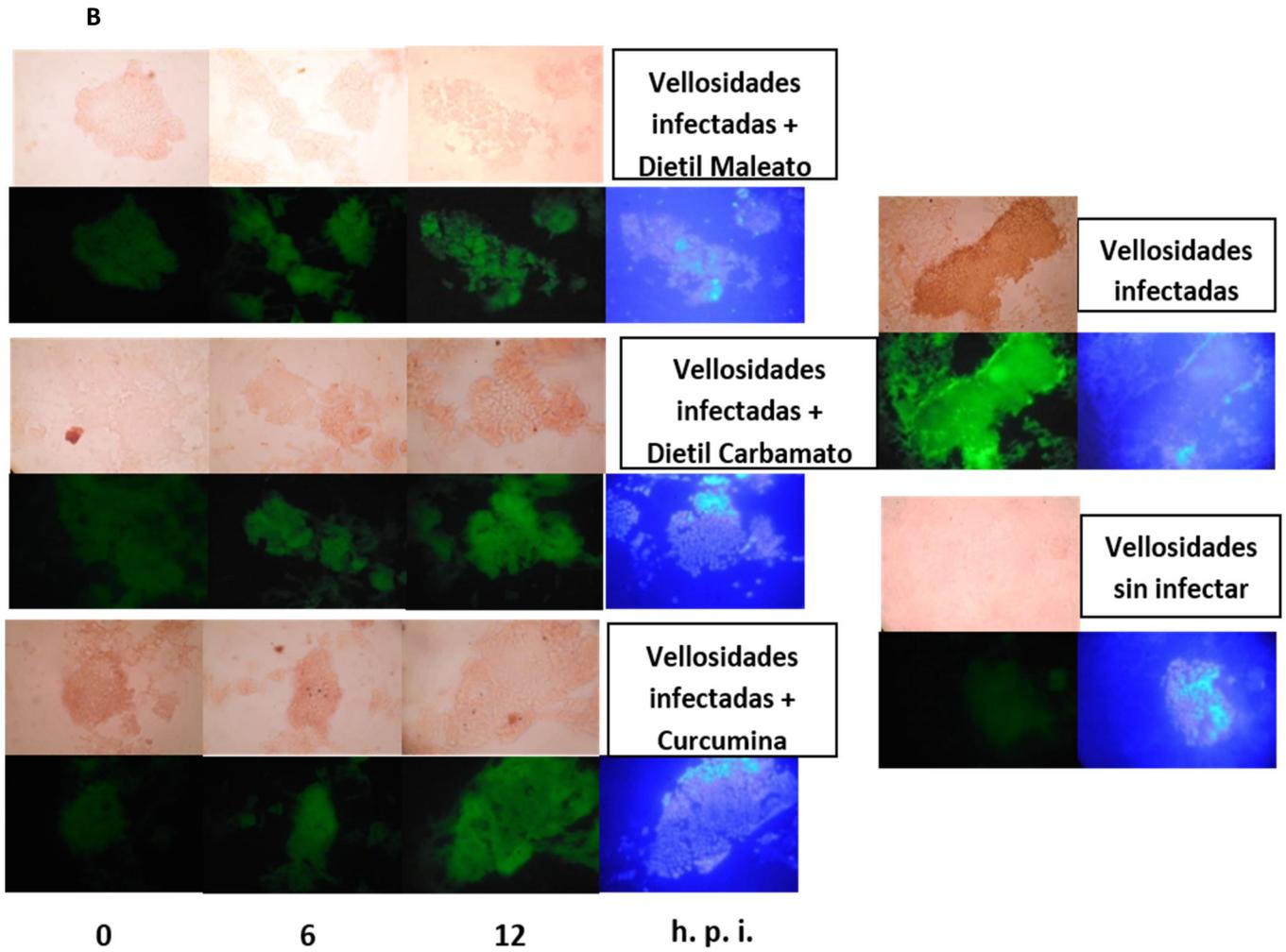


Tabla 11. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para COX-2. M representa la media aritmética, SD La desviación estándar, D la diferencia porcentual frente al control de células infectadas sin ningún tratamiento y S la significancia de esta diferencia. S se graficó de acuerdo a las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces.

TRATAMIENTOS	h.p.i	Intensidad media de fluorescencia COX			
		M	SD	D (%)	S
Células Infectadas (C.I.)	0	60,6	2,82		
	6	74,4	4,00		
	12	93,4	5,61		
Células sin Infectar (C.S.I.)	0	20,2	4,74	66,6	***
	6	22,4	4,28	69,9	***
	12	20,3	4,85	78,2	***
Curcumina (Cur)	0	45,1	6,51	25,6	**
	6	40,0	6,38	46,2	***
	12	67,6	7,28	27,7	**
Dietil-Carbamato (DC)	0	47,5	2,66	21,7	**
	6	65,0	5,97	12,6	*
	12	72,6	2,47	22,3	**
Dietil-Maleato (DM)	0	43,6	3,74	28,0	***
	6	61,3	3,78	17,6	*
	12	70,6	6,81	24,5	**

Al igual que la evaluación de las proteínas NF-kB y PPAR γ , al cotejar las fotos representativas de inmunocitoquímica, se observa la disminución de la infección en comparación con el C.I. para cada uno de los inhibidores, comparadas con fotos de inmunofluorescencia donde se observa reducción en la expresión de la proteína COX-2 con respecto a C.I., además de cotejar estas con las fotos de Hoechst (Figura 12B).

8.5 Los inhibidores específicos de NF- κ B en vellosidades intestinales de ratón ICR alteran la expresión de especies reactivas de oxígeno.

Para determinar si las especies reactivas de oxígeno ROS, cambian en Vellosidades infectadas con rotavirus y luego ser tratadas con los inhibidores de NF- κ B (curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato), en concentración de 100 μ M se cosecharon a diferentes horas (0, 6 y 12 h.p.t.) y se utilizó el Kit Oxidative Stress, se tomaron fotografías en el microscopio Van Guard utilizando una lente 100X. Se analizó a través de fluorescencia los cambios de ROS en los diferentes tratamientos en células infectadas, comparando con los respectivos controles (Figura 13). Para poder expresar y determinar el aumento o disminución en la expresión de ROS, los resultados se reportaron como intensidad media de fluorescencia (Figura 13A) a partir del conteo de 10 fotografías representativas, mediante el programa ImageJ (Figura 13B).

Vellosidades sin infectar (C.S.I.) presentaron intensidad media de fluorescencia 20,50, 22,41 y 23,58 a las 0, 6, 12 h.p.t. respectivamente, lo que equivale transformado a porcentajes a 76,64%, 76,37% y 75,22%, en la reducción de la expresión de ROS en comparación con células infectadas y no tratadas (C.I.), el cual presentó intensidades de fluorescencias de 87,74, 94,84 y 95,15 a las 0, 6, y 12 h.p.t. respectivamente (Tabla 12). La intensidad media de fluorescencia para ROS en células tratadas con curcumina a las 0, 6 y 12 h.p.t. fue de 34,21, 41,38 y 49,67, la cual representa porcentualmente una reducción en la expresión de ROS de 61,01%, 56,37% y 47,80% respectivamente, comparada con el C.I. (Figura 13A), con varianza muy significativa en la reducción con el tratamiento en las h.p.t. evaluadas. Caso similar presenta la evaluación de células tratadas con dietil-carbamato en significancia estadística, presentando intensidad media de fluorescencia 41,29, 42,58 y 49,97 a las 0, 6 y 12 h.p.t. correspondientemente, equivalente porcentualmente a una reducción de la expresión de ROS de 52,94%, 55,11% y 47,49%, estadísticamente muy significativo en las diferentes h.p.t. (0, 6 y 12h), en comparación con C.I.. Para dietil-maleato la reducción en la expresión de ROS fue estadísticamente muy significativo a las 0, 6 y 12 h.p.t con porcentajes 70,79%, 49,86% y 45,36%, en la reducción de la expresión de ROS (Figura 13A) y una intensidad media de fluorescencia de 25,63, 47,56 y 52,00 correspondientemente, todo esto en comparación con el respectivo C.I. (Tabla 12).

Figura 13. La expresión de las especies reactivas de oxígeno (ERO o “ROS”) cambian al tratar con inhibidores de NF- κ B en Vellosidades infectadas con rotavirus. A. Vellosidades infectadas con rotavirus y luego tratadas con inhibidores, se utilizó el Kit Oxidative Stress, las Vellosidades se fijaron con paraformaldehído al 4%, se incubaron a 37°C, se lavaron con PBS y finalmente se fotografiaron en el microscopio Van Guard utilizando una lente 100X. **B.** Revelados por inmunofluorescencia de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS o EROs) con el dihidroetidio (DHE) en vellosidades cosechadas a las 0 - 12h.p.t. analizadas con Hoechst para observar fragmentación de ADN.

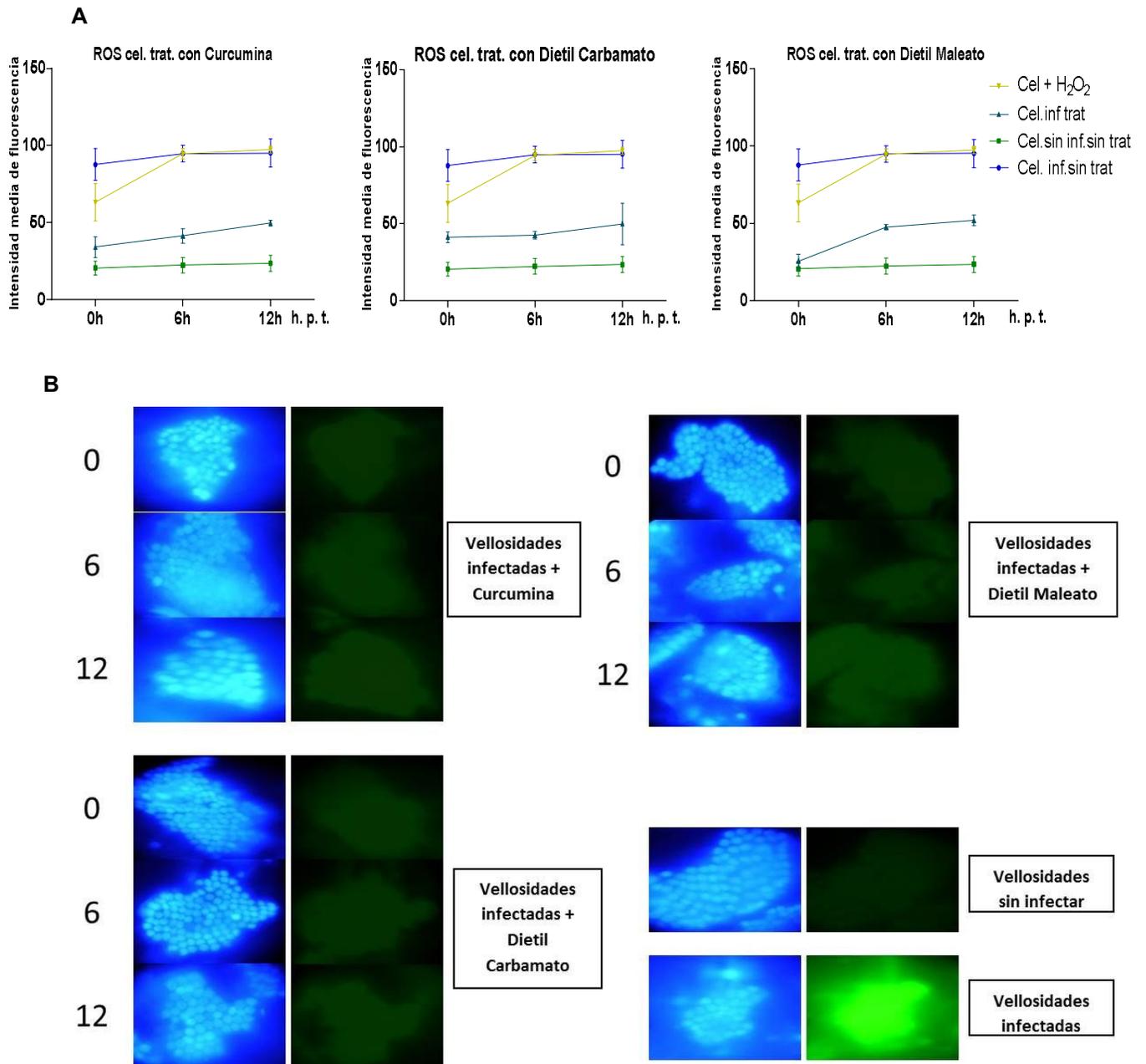


Tabla 12. Tratamiento estadístico del Conteo del porcentaje intensidad media de fluorescencia en las Vellosidades infectadas y tratadas con inhibidores de NF-kB para ROS. M representa la media aritmética, SD La desviación estándar, D la diferencia porcentual frente al control de células infectadas sin ningún tratamiento y S la significancia de esta diferencia. S se graficó de acuerdo a las siguientes convenciones: ns= P>0.05 (no significativo); *= P<0.05 (significativo); ** = P<0.01 (muy significativo); *** = P< 0.001 (altamente significativo). Los ensayos fueron realizados por duplicado y el procedimiento fue repetido 3 veces

TRATAMIENTOS	h.p.i	Intensidad media de fluorescencia ROS			
		M	SD	D (%)	S
Células Infectadas (C.I.)	0	87,74	4,20		
	6	94,84	2,16		
	12	95,15	3,68		
Células sin Infectar (C.S.I.)	0	20,50	1,87	76,64	**
	6	22,41	2,06	76,37	**
	12	23,58	2,08	75,22	**
Curcumina (Cur)	0	34,21	2,77	61,01	**
	6	41,38	1,92	56,37	**
	12	49,67	0,82	47,80	**
Dietyl-Carbamato (DC)	0	41,29	1,40	52,94	**
	6	42,58	0,97	55,11	**
	12	49,97	5,52	47,49	**
Dietyl-Maleato (DM)	0	25,63	1,80	70,79	**
	6	47,56	0,71	49,86	**
	12	52,00	1,35	45,36	**
CONTROL: Peróxido De Hidrógeno (H2O2)	0	73,22	4,95		ns
	6	94,62	1,45		
	12	97,40	0,95		

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Estudios previos han indicado que los rotavirus en general dependen de la maquinaria celular, generando y beneficiándose de ambientes oxidativos y procesos pro-inflamatorios para poder infectar y replicarse [7, 8, 15, 119]. Asimismo se ha estudiado una gran variedad de fármacos, especialmente agentes que actúen en los cambios de reacciones redox a nivel celular, tales como vitamina C, ibuprofeno, diclofenaco, NAC y agonistas de PPAR γ , que reportan una disminución en la infección por rotavirus [7, 8, 15, 17, 22]. Adicionalmente se ha reportado que el agonistas pioglitazona al activar el receptor PPAR γ , altera la cascada de señalización necesarios para la infección causada por rotavirus [17], a través de su acción inhibitoria natural sobre NF-kB [7, 17, 120]. El factor de transcripción NF-kB está implicado en la síntesis de prostaglandinas y se ha reportado que son necesarias para la infección por rotavirus en células caco-2 [7, 121].

Reportes anteriores ya habían implicado a la molécula NF-kB en la infección por rotavirus e igualmente con otros virus; además se han estudiado las moléculas relacionadas con NF-kB, como PPAR γ y COX-2 [6, 7, 16-18, 23, 119, 120], pero pocas veces se ha estudiado directamente la proteína NF-kB en la infección por rotavirus, utilizando fármacos que tuvieran acción sobre la molécula.

Para hallar la concentración con mayor efecto inhibitorio, sobre la infección de rotavirus ECwt en vellosidades intestinales de ratón ICR, se evaluaron varias concentraciones (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M y 100 μ M) para los tres inhibidores; se encontró que 100 μ M en los tres inhibidores fue la que presentó los mayores porcentajes en reducción de la infección (Figura 6 y Tabla 1). Concentraciones mayores presentaron reducción de la infección (ANEXO A, C y E), pero con un porcentaje elevado en muerte celular (ANEXO B, D y F), probablemente por la toxicidad aumentada en las concentraciones de los diluyentes (DMSO o Metanol). Esta concentración de 100 μ M utilizada en las vellosidades intestinales extraídas de ratón ICR no presentó citotoxicidad significativa al cabo de las 12 h.p.t (Figura 7), al examinar a través de la técnica de azul de tripan, ya que la variación en los tres inhibidores no superó el 2,1% de vellosidades no viables, con los tratamientos después de las 12 h.p.t. (Tabla 2). Lo que permite sugerir que la concentración de 100 μ M está regulando a NF-kB,

inhibiendo o interfiriendo sobre la infección vírica en vellosidades aisladas. En el conteo se tuvo en cuenta vellosidades y no enterocitos desprendidos, porque en literatura se conoce que pasada dos horas luego de ser desprendidas de la vellosidad, entran en muerte celular programada (apoptosis) denominada “anoikis” [58, 122].

La forma en como los inhibidores actúan sobre NF- κ B es evitando su activación, específicamente bloqueando cascada abajo su fosforilación, inhibiendo la translocación al núcleo de la proteína 50 (p50-NF- κ B) [99, 107, 111], por lo que se evaluó la expresión de dicha proteína cuando está se encontraba fosforilada (pNF- κ B), es decir su forma activa en vellosidades infectadas con rotavirus y tratadas con los inhibidores (curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato). La proteína 50-pNF- κ B se evaluó mediante técnicas como inmunofluorescencia (intensidad media de fluorescencia) y Western Blotting. Se encontró que los inhibidores disminuyen la intensidad media de fluorescencia, así mismo como la cantidad de proteína observado por WB, comparado con las células infectadas sin tratamiento (Figura 9A, C), sugiriendo una disminución de manera directa o indirecta como antioxidante en la expresión y actividad de pNF- κ B. El aumento de pNF- κ B coincide con la infección de rotavirus y la disminución de pNF- κ B con la menor detección de los antígenos virales, cuando las vellosidades infectadas se tratan con los inhibidores de NF- κ B (Figura 9B). No se sabe si esto ocurre porque el rotavirus induce directamente a NF- κ B o la célula aumenta su expresión como mecanismo de defensa contra la infección. Sin embargo, dado que la infección disminuye al disminuir la expresión de pNF- κ B, por el tratamiento con los inhibidores, es probable que el virus se esté beneficiando por la reacción de la célula que activa mecanismos pro-inflamatorios, como se ha evidenciado en varios virus [123], como es el caso del virus VIH-1 [124, 125], virus Epstein-Barr [126], virus de influenza (gripe) [127] entre otros virus [128]. La idea de que el rotavirus se beneficia de la actividad bioquímica pro-inflamatoria, es apoyada por los resultados obtenidos con ROS. Al evaluar ROS se encontró que aumenta con la infección de rotavirus y disminuye su expresión, cuando las células infectadas se tratan con los inhibidores de NF- κ B (Figura 13A). Es probable que el rotavirus induzca la expresión de ROS, aunque se desconoce el mecanismo o que la célula aumente la expresión de pNF- κ B, como defensa antiviral y el aumento de pNF- κ B induzca el aumento de ROS. Se conoce que ROS puede modular la expresión de

NF- κ B y que los genes blanco de NF- κ B atenúan la sobreexpresión de ROS [129-131]. Esto sugiere que rotavirus ha co-evolucionado en diferentes estrategias para beneficiarse con la respuesta inflamatoria y lo utiliza para hacer más eficiente su replicación [10]. Se sabe por estudios que el rotavirus en su etapa temprana de infección, necesita bloquear la respuesta inmune innata en la célula huésped, como se ha confirmado en diferentes estudios donde la proteína no estructura NSP1 de rotavirus humano del grupo A, contiene un motivo de reconocimiento C-terminal (DSGxS) para la proteína que contiene repeticiones β -transductoras (β -TrCP) [132]. Esta característica permite a NSP1 antagonizar las vías de señalización de IFN, al interactuar con el inhibidor de NF- κ B dependiente de la degradación en el proteosoma por β -TrCP [133, 134] y evitar así la respuesta celular. Así mismo la evidencia en el aumento en la expresión de la proteína al final del experimento, puede estar ligado a reportes que señalan que rotavirus utiliza a NSP4 para ejercer, al parecer, la interrupción del equilibrio redox, induciendo la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD), a través de la activación del factor NF- κ B por ROS [135], además el desequilibrio redox también es una afección desde y en el retículo endoplasmático [136, 137], donde el rotavirus utiliza la maquinaria celular para el plegamiento de proteínas en la replicación y generación de nuevos viriones. Esto se deduce porque al evaluar la formación de partículas virales en las vellosidades infectadas o infectadas y tratadas con los inhibidores de NF- κ B, mediante la reinfección, se encontró que disminuye el número de partículas virales infecciosas, pero no se suprime (Figura 8C). Es decir, el virus se ensambla, pero menos eficientemente, sugiriendo que el ambiente oxidativo, generado por NF- κ B y ROS facilita de alguna manera el ensamblaje viral. No se evaluó si se afecta la replicación, la transcripción o la síntesis de proteínas virales. Tampoco se estudió la acción de los inhibidores sobre la fosforilación o ubiquitinación del complejo I κ B kinasa inhibidor natural de NF- κ B [71, 80] y que también presentan acción antioxidante y antiinflamatoria. Lo anterior lleva a sugerir que los reactivos pueden tener actividad antioxidante que disminuye ROS, esto disminuye NF- κ B [104, 126, 127, 138, 139] y a su vez esta regula la expresión de ROS. Probablemente al disminuir NF- κ B disminuya o se inactiven proteínas o actividad genética generadora de ROS.

Debido a que NF- κ B se relaciona en múltiples reportes con la infección, no solo de rotavirus sino de otros virus [11, 128, 140], se ve como un posible candidato para tratamiento de infecciones virales, que se benefician del mecanismo descrito. Es así que después de comprobar el efecto de los inhibidores en la expresión de la proteína NF- κ B y en la infección por rotavirus, para complementar su estudio, se buscó evaluar los fármacos en las vellosidades pre-tratando las células con los inhibidores y comparando con células infectadas y luego tratadas. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína pNF- κ B (Figura 10B), ni en la reducción de antígenos virales (Figura 10A), al tratar antes o después de la infección con rotavirus, pero si existe diferencias estadísticamente significativas comparando los dos casos de tratamientos con el C.I. (Tabla 6, 9). Según los resultados se sugiere que la actividad de NF- κ B es esencial para la infección exitosa del rotavirus a la célula. Ya que al interferir dicha actividad con los inhibidores antes, durante o después de la internalización del virus a la célula, altera el proceso infeccioso.

Se conoce que con agonistas de PPAR γ se modula la respuesta inflamatoria, interfiriendo con la translocación al núcleo de NF- κ B, evitando la transcripción de factores necesarios en la infección y que han demostrado que reducen la infección con rotavirus [7, 8, 17, 18, 120]. Por esto, se evaluó la expresión de dicha proteína en vellosidades infectadas y en vellosidades infectadas y tratadas con los inhibidores específicos de la proteína NF- κ B curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato. Las técnicas de inmunofluorescencia y Western Blot (Figura 11A, C), usadas para este fin, mostraron que la proteína PPAR γ aumentaba cuando las vellosidades eran infectadas con respecto a vellosidades sin infección ni tratamiento. En vellosidades que se infectaron y se agregaron los inhibidores específicos de NF- κ B, se redujo la intensidad media de fluorescencia de la proteína (Figura 7A), con porcentajes en los tres inhibidores, al menos con reducciones significativas al comparar con el C.I. (Tabla 10). Teniendo en cuenta que PPAR γ es un regulador negativo de NF- κ B, en el citoplasma y en el núcleo, los resultados obtenidos permiten sugerir que PPAR γ es un mecanismo celular para controlar la sobreexpresión de NF- κ B en la infección viral, por lo tanto, al inhibir NF- κ B se disminuye PPAR γ (Figura 11). Además sus valores por debajo del C.I. puede ser por que los inhibidores también actúan como antioxidante

[104, 138, 139], que conllevan según reportes a la inhibición de vías pro-inflamatorias y equilibrio redox, necesarias en estos procesos infecciosos [7, 8, 17, 120, 141].

La proteína COX-2 interfiere con la infección por rotavirus y lo relacionan con la molécula NF- κ B, por su regulación en la transcripción de este factor pro-inflamatorio [6, 7, 142, 143]. Por tal motivo, se evaluó la variación en la expresión de esta proteína en vellosidades aisladas, tratadas con los inhibidores específicos de la proteína NF- κ B, mediante las técnicas de inmunofluorescencia y Western Blot (Figuras 12). Se encontró que la expresión de COX-2 aumenta en vellosidades infectadas y disminuye en las vellosidades tratadas con los inhibidores (Figuras 12A, C), con porcentajes estadísticamente significativos en la reducción de la proteína (Tabla 11). Estos resultados sugieren que el virus aumenta la expresión de COX-2 porque probablemente este factor sea necesario para la infección o aumente su expresión como respuesta de la célula a la infección rotaviral, asimismo los datos obtenidos presenta similitud en lo descrito para la proteína NF- κ B (Figura 10B) ya que con los fármacos inhibidores interfiere con su translocación al núcleo y de esta manera en la transcripción de COX-2 [121, 144, 145]

Este trabajo sugiere que en la infección de rotavirus ECwt, el factor de transcripción NF- κ B juega un papel muy importante, porque participa en la expresión de genes implicados en respuestas inflamatorias inmunes y de estrés oxidativo, lo que puede sugerir que en eventos posteriores de ensamblaje y replicación vírica podría beneficiarse de esta respuesta pro inflamatoria y de la alteración del equilibrio redox [120]

10 CONCLUSIONES.

El rotavirus ECwt incrementa la expresión de la proteína NF- κ B y de proteínas relacionadas con esta, tales como PPAR γ y COX-2, además de los niveles de ROS en vellosidades aisladas de ratón ICR infectadas con el virus; asimismo el uso de inhibidores de NF- κ B tales como curcumina, dietil-carbamato y dietil-maleato disminuyen la expresión de estas proteínas, como también los niveles de ROS y reduce la producción de antígenos virales. Esto sugiere que el virus, para completar su ciclo infeccioso en forma eficiente en el modelo *in vitro* con vellosidades de ratón ICR, necesita activar o tener activo el factor de transcripción NF- κ B durante la síntesis y replicación de su genoma viral.

11 RECOMENDACIONES.

1. Se requiere conocer si el virus interactúa directamente con las moléculas presentes en la vía NF- κ B o con el gen.
2. Es necesario hacer más estudios para profundizar en qué etapa del ciclo infeccioso del rotavirus se necesita activo NF- κ B.

12 BIBLIOGRAFIA.

1. Organization, W.H., *Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 2017. **44**(92): p. 661–680.
2. Burnett, E., et al., *Estimated impact of rotavirus vaccine on hospitalizations and deaths from rotavirus diarrhea among children <5 in Asia*. Expert review of vaccines, 2018. **17**(5): p. 453-460.
3. Parashar, U.D., et al., *Rotavirus and severe childhood diarrhea*. Emerging infectious diseases, 2006. **12**(2): p. 304-6.
4. Dennehy, P.H., *Rotavirus vaccines: an overview*. Clinical microbiology reviews, 2008. **21**(1): p. 198-208.
5. Calderón, M.G., F. Acosta, O. Guerrero, C. A., *Rotavirus VP4 and VP7-derived synthetic peptides as potential substrates of protein disulfide isomerase lead to inhibition of rotavirus infection*. Int J Pept Res Ther, 2012. **18**(4): p. 373–382.
6. Rodríguez, A.V.H., *Determinación del cambio en la expresión de las proteínas COX, PDI, Hsc70, Hsp70, ERp57 y PPARγ en células intestinales aisladas de ratones ICR lactantes infectados con Rotavirus ECwt y posteriormente tratados con N-Acetilcisteína*, in Facultad de Medicina 2012, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 67.
7. Guerrero, C.A., V.R. Paula Pardo, and O.A. Rafael Guerrero, *Inhibition of rotavirus ECwt infection in ICR suckling mice by N-acetylcysteine, peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists and cyclooxygenase-2 inhibitors*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2013. **108**(6): p. 741-54.
8. Guerrero, C.A., A. Murillo, and O. Acosta, *Inhibition of rotavirus infection in cultured cells by N-acetyl-cysteine, PPARgamma agonists and NSAIDs*. Antiviral Res, 2012. **96**(1): p. 1-12.
9. Santana, A.Y., C.A. Guerrero, and O. Acosta, *Implication of Hsc70, PDI and integrin alphavbeta3 involvement during entry of the murine rotavirus ECwt into small-intestinal villi of suckling mice*. Arch Virol, 2013. **158**(6): p. 1323-36.
10. Santoro, M.G., A. Rossi, and C. Amici, *NF-kappaB and virus infection: who controls whom*. EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2552-60.
11. Barnes, P.J. and M. Karin, *Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases*. The New England journal of medicine, 1997. **336**(15): p. 1066-71.
12. Decramer, M., et al., *Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2005. **365**(9470): p. 1552-60.

13. Ruffmann, R.W., A., *GSH rescue by N-acetylcysteine*. J Mol Med, 1991. **69**(18): p. 857.
14. Gualtero, D.F., et al., *Amino acid domains 280-297 of VP6 and 531-554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection*. Arch Virol, 2007. **152**(12): p. 2183-96.
15. Calderon, M.N., et al., *Inhibiting rotavirus infection by membrane-impermeant thiol/disulfide exchange blockers and antibodies against protein disulfide isomerase*. Intervirology, 2012. **55**(6): p. 451-64.
16. Gómez, M.D.L., *Evaluación de la expresión de las proteínas PPARγ Y NFκB en vellosidades intestinales de ratones adultos ICR infectados con Rotavirus ECwt y tratados con pioglitazona*, in Facultad de Medicina2013, Universidad Nacional de Colombia
17. Gomez, D., et al., *PPARγ agonists as an Anti-Inflammatory Treatment Inhibiting Rotavirus Infection of Small Intestinal Villi*. PPAR Res, 2016. **2016**: p. 4049373.
18. Youssef, J. and M. Badr, *Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation Control*. J Biomed Biotechnol, 2004. **2004**(3): p. 156-166.
19. Buttery, J.P., et al., *Intussusception following rotavirus vaccine administration: post-marketing surveillance in the National Immunization Program in Australia*. Vaccine, 2011. **29**(16): p. 3061-6.
20. Shui, I.M., et al., *Risk of intussusception following administration of a pentavalent rotavirus vaccine in US infants*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2012. **307**(6): p. 598-604.
21. Weintraub, E.S., et al., *Risk of intussusception after monovalent rotavirus vaccination*. N Engl J Med, 2014. **370**(6): p. 513-9.
22. Rossen, J.W., et al., *Inhibition of cyclooxygenase activity reduces rotavirus infection at a postbinding step*. J Virol, 2004. **78**(18): p. 9721-30.
23. Hong, C. and P. Tontonoz, *Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(5): p. 461-7.
24. Romero, C.R., *Microbiología y parasitología humana*. 3ª ed, ed. Panamericana. 2007. 1727.
25. Pesavento, J.B., et al., *Rotavirus proteins: structure and assembly*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **309**: p. 189-219.
26. Estes, M.K. and J. Cohen, *Rotavirus gene structure and function*. Microbiol Rev, 1989. **53**(4): p. 410-49.

27. McClain, B., et al., *X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution*. J Mol Biol, 2010. **397**(2): p. 587-99.
28. Arnoldi, F., et al., *Interaction of rotavirus polymerase VP1 with nonstructural protein NSP5 is stronger than that with NSP2*. J Virol, 2007. **81**(5): p. 2128-37.
29. Svensson, L., et al., *Intracellular manipulation of disulfide bond formation in rotavirus proteins during assembly*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5204-15.
30. Lopez, S. and C.F. Arias, *Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance*. Trends Microbiol, 2004. **12**(6): p. 271-8.
31. Arias, C.F., et al., *Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 5832-9.
32. Ludert, J.E., et al., *Cleavage of rotavirus VP4 in vivo*. J Gen Virol, 1996. **77 (Pt 3)**: p. 391-5.
33. Zarate, S., et al., *The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells*. J Virol, 2000. **74**(2): p. 593-9.
34. Benureau, Y., et al., *Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 11): p. 3143-51.
35. Zarate, S., et al., *VP7 mediates the interaction of rotaviruses with integrin α 5 β 3 through a novel integrin-binding site*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10839-47.
36. Contin, R., Arnoldi F., Campagna M. and Burrone O. R, *Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins*. Journal of General Virology, 2010. **91**(7): p. 1782–1793.
37. Crawford, S.E., et al., *Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 4820-32.
38. Pavel, I.G., M, Arias, C.F., López, S., *Rotavirus cell entry*. Future Virol, 2008. **3** (2): p. 135-146.
39. Estes, M.K., et al., *Simian rotavirus SA11 replication in cell cultures*. J Virol, 1979. **31**(3): p. 810-5.
40. Crawford, S.E., et al., *Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike*. J Virol, 2001. **75**(13): p. 6052-61.
41. Guerrero, C.A., et al., *Heat shock cognate protein 70 is involved in rotavirus cell entry*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4096-102.
42. Wilkinson, B. and H.F. Gilbert, *Protein disulfide isomerase*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1699**(1-2): p. 35-44.

43. Gutierrez, M., et al., *Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9161-9.
44. Sanchez-San Martin, C., et al., *Characterization of rotavirus cell entry*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2310-8.
45. Zarate, S., et al., *Interaction of rotaviruses with Hsc70 during cell entry is mediated by VP5*. J Virol, 2003. **77**(13): p. 7254-60.
46. Kim, I.S., et al., *Effect of mutations in VP5 hydrophobic loops on rotavirus cell entry*. J Virol, 2010. **84**(12): p. 6200-7.
47. Fuentes-Panana, E.M., et al., *Mapping the hemagglutination domain of rotaviruses*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2629-32.
48. Guerrero, C.A., et al., *Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells*. J Virol, 2000. **74**(20): p. 9362-71.
49. Estes, M.K., Graham, D.Y. Dimitrov, D.H., *The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis*. Prog Med Virol, 1984. **29**: p. 1-22
50. Fernandes, J., et al., *Binding of reovirus to receptor leads to conformational changes in viral capsid proteins that are reversible upon virus detachment*. J Biol Chem, 1994. **269**(25): p. 17043-7.
51. Gruber, C.W., et al., *Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(8): p. 455-64.
52. Ellgaard, L. and L.W. Ruddock, *The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties*. EMBO Rep, 2005. **6**(1): p. 28-32.
53. Maruri-Avidal, L., S. Lopez, and C.F. Arias, *Endoplasmic reticulum chaperones are involved in the morphogenesis of rotavirus infectious particles*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5368-80.
54. Calderón, M.N., Acosta, O., Guzman, F., Guerrero, C. A, *Protein disulfide isomerase activity is involved in rotavirus entry to MA104 cells*. Intervirology, 2011. **31**(70-81).
55. Sharma, D. and D.C. Masison, *Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions*. Protein Pept Lett, 2009. **16**(6): p. 571-81.
56. de Jong, P.R., et al., *Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effects*. Cell Stress Chaperones, 2009. **14**(2): p. 117-31.

57. Pulido, D., Acosta O, Guerrero CA, *Increase of heat shock cognate protein, HSC70, in MA104 cells following rotavirus infection*. Rev.Fac.Med, 2007. **55**: p. 224-239.
58. Guerrero, C.A., A.Y. Santana, and O. Acosta, *Mouse intestinal villi as a model system for studies of rotavirus infection*. J Virol Methods, 2010. **168**(1-2): p. 22-30.
59. FitzGerald, G.A., *COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(11): p. 879-90.
60. Mbonye, U.R. and I. Song, *Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression*. BMB Rep, 2009. **42**(9): p. 552-60.
61. Butterfield, D.A., B.J. Howard, and M.A. LaFontaine, *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, 2001. **8**(7): p. 815-28.
62. Krishnan, A., S.A. Nair, and M.R. Pillai, *Biology of PPAR gamma in cancer: a critical review on existing lacunae*. Curr Mol Med, 2007. **7**(6): p. 532-40.
63. Fajas, L., M.B. Debril, and J. Auwerx, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis*. J Mol Endocrinol, 2001. **27**(1): p. 1-9.
64. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
65. Kliewer, S.A., et al., *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. Cell, 1995. **83**(5): p. 813-9.
66. Lehmann, J.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3406-10.
67. Stumvoll, M. and H.U. Haring, *Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms*. Ann Med, 2002. **34**(3): p. 217-24.
68. Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation*. Inflamm Res, 2000. **49**(10): p. 497-505.
69. Delerive, P., J.C. Fruchart, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control*. J Endocrinol, 2001. **169**(3): p. 453-9.
70. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.

71. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 725-34.
72. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
73. Verma, I.M., et al., *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation*. Genes Dev, 1995. **9**(22): p. 2723-35.
74. Memet, S., *NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1180-95.
75. Echeverri, N.P.M., I, *Factor nuclear kb (nf-kb): signalosoma y su importancia en enfermedades inflamatorias y cáncer*. Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, 2008. **56**(2): p. 133-146.
76. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
77. Amir, R.E., K. Iwai, and A. Ciechanover, *The NEDD8 pathway is essential for SCF(beta -TrCP)-mediated ubiquitination and processing of the NF-kappa B precursor p105*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23253-9.
78. Mincheva, S., *Estudio de la Función de la vía NF-kappaB en las motoneuronas espinales y su relación con la atrofia muscular espinal*, in Departament de Ciencies2011, Universitat de Lleida: Tesis Doctoral. p. 226.
79. Beinke, S. and S.C. Ley, *Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology*. Biochem J, 2004. **382**(Pt 2): p. 393-409.
80. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
81. Roman, J.A., Jiménez, S.A, *El Factor Nuclear-kB como un blanco terapéutico en artrifis*. Revista Peruana de Reumatología, 2004. **10**(3): p. 43-48.
82. Sun, S.C., *Non-canonical NF-kappaB signaling pathway*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 71-85.
83. Chen, F., et al., *Phosphorylation of PPARgamma via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF-kappabeta*. J Cell Biochem, 2003. **90**(4): p. 732-44.
84. LaMonica, R., et al., *VP4 differentially regulates TRAF2 signaling, disengaging JNK activation while directing NF-kappa B to effect rotavirus-specific cellular responses*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 19889-96.

85. Peiris, J.S., K.P. Hui, and H.L. Yen, *Host response to influenza virus: protection versus immunopathology*. *Curr Opin Immunol*, 2010. **22**(4): p. 475-81.
86. Treitinger, A., et al., *Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus*. *Eur J Clin Invest*, 2000. **30**(5): p. 454-9.
87. Boya, P., et al., *Antioxidant status and glutathione metabolism in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C*. *J Hepatol*, 1999. **31**(5): p. 808-14.
88. Dikici, I., et al., *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*, 2005. **38**(12): p. 1141-4.
89. Dörmeyer, T.S., et al., *Ex vivo induction of apoptosis in lymphocytes is mediated by oxidative stress: role for lymphocyte loss in HIV infection*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **22**(5): p. 775-85.
90. Knobil, K., et al., *Role of oxidants in influenza virus-induced gene expression*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 1): p. L134-42.
91. Korenaga, M., et al., *Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(45): p. 37481-8.
92. Skulachev, V.P., *Possible role of reactive oxygen species in antiviral defense*. *Biochemistry (Mosc)*, 1998. **63**(12): p. 1438-40.
93. Prasad, S., A.K. Tyagi, and B.B. Aggarwal, *Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice*. *Cancer Res Treat*, 2014. **46**(1): p. 2-18.
94. Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. *Mol Pharm*, 2007. **4**(6): p. 807-18.
95. Gupta, S.C., et al., *Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals*. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. **29**(3): p. 405-34.
96. Cheng, A.L., et al., *Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions*. *Anticancer Res*, 2001. **21**(4B): p. 2895-900.
97. Lao, C.D., et al., *Dose escalation of a curcuminoid formulation*. *BMC Complement Altern Med*, 2006. **6**: p. 10.
98. Shoba, G., et al., *Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers*. *Planta Med*, 1998. **64**(4): p. 353-6.

99. Singh, S. and B.B. Aggarwal, *Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]*. J Biol Chem, 1995. **270**(42): p. 24995-5000.
100. (EMA), E.M.A., *Assessment report on Curcuma xanthorrhiza Roxb. (C. xanthorrhiza D. Dietrich).*, rhizoma European Medicines Agency (EMA), 2013. **EMA/HMPC/604598/2012**.
101. Eneanya, D.I., et al., *The actions of metabolic fate of disulfiram*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1981. **21**: p. 575-96.
102. Langeland, B.T. and J.S. McKinley-McKee, *The effects of disulfiram on equine hepatic alcohol dehydrogenase and its efficiency against alcoholism: vinegar effect*. Alcohol Alcohol, 1996. **31**(1): p. 75-80.
103. Suh, J.J., et al., *The status of disulfiram: a half of a century later*. J Clin Psychopharmacol, 2006. **26**(3): p. 290-302.
104. Schreck, R., et al., *Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells*. J Exp Med, 1992. **175**(5): p. 1181-94.
105. Matsuno, T., et al., *Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in HHV-8-infected primary effusion lymphoma cells via inhibition of the NF-kappaB pathway*. Int J Oncol, 2012. **40**(4): p. 1071-8.
106. Pang, H., et al., *Sodium diethyldithiocarbamate, an AIDS progression inhibitor and a copper-binding compound, has proteasome-inhibitory and apoptosis-inducing activities in cancer cells*. Int J Mol Med, 2007. **19**(5): p. 809-16.
107. Cvek, B. and Z. Dvorak, *Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(30): p. 3155-67.
108. Rahden-Staron, I., et al., *The effects of sodium diethyldithiocarbamate in fibroblasts V79 cells in relation to cytotoxicity, antioxidative enzymes, glutathione, and apoptosis*. Arch Toxicol, 2012. **86**(12): p. 1841-50.
109. Korablev, M.V., *[Toxicological characteristic of dithiocarbamic acid derivatives used in the national economy and medicine. (Review)]*. Farmakol Toksikol, 1969. **32**(3): p. 356-62.
110. Craven, M.R., D.K. Luscombe, and P.J. Nicholls, *Absorption, elimination and duration of action of diethyldithiocarbamate in animals [proceedings]*. J Pharm Pharmacol, 1976. **28 Suppl**: p. 38P.
111. Horton, N.D., et al., *Acrolein causes inhibitor kappaB-independent decreases in nuclear factor kappaB activation in human lung adenocarcinoma (A549) cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9200-6.

112. Smyth, H.F., Jr., C.P. Carpenter, and C.S. Weil, *Range-finding toxicity data; list III*. J Ind Hyg Toxicol, 1949. **31**(1): p. 60-2.
113. Instituto Nacional de Salud. INS. [Online]
Available from: www.ins.gov.co, 2012.
114. Henrotin, Y., et al., *Biological actions of curcumin on articular chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(2): p. 141-9.
115. Shishodia, S., et al., *Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1*. Carcinogenesis, 2003. **24**(7): p. 1269-79.
116. Srikoon, P., et al., *Diethyldithiocarbamate suppresses an NF-kappaB dependent metastatic pathway in cholangiocarcinoma cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(7): p. 4441-6.
117. Khoo, J.P., et al., *EPR quantification of vascular nitric oxide production in genetically modified mouse models*. Nitric Oxide, 2004. **10**(3): p. 156-61.
118. Du, H., et al., *Inhibition of COX-2 expression by endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is mediated via PPAR-gamma*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(7): p. 1533-49.
119. Rodriguez-Diaz, J., et al., *Role of nitric oxide during rotavirus infection*. J Med Virol, 2006. **78**(7): p. 979-85.
120. Guerrero, C.A. and O. Acosta, *Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection*. World J Virol, 2016. **5**(2): p. 38-62.
121. Poligone, B. and A.S. Baldwin, *Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38658-64.
122. Lugo-Martinez, V.H., et al., *Epidermal growth factor receptor is involved in enterocyte anoikis through the dismantling of E-cadherin-mediated junctions*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(2): p. G235-44.
123. Perkins, N.D. and T.D. Gilmore, *Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 759-72.
124. Teramoto, S., et al., *Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione*. Jpn J Pharmacol, 1999. **79**(1): p. 33-40.
125. Ginn-Pease, M.E. and R.L. Whisler, *Optimal NF kappa B mediated transcriptional responses in Jurkat T cells exposed to oxidative stress are dependent on intracellular*

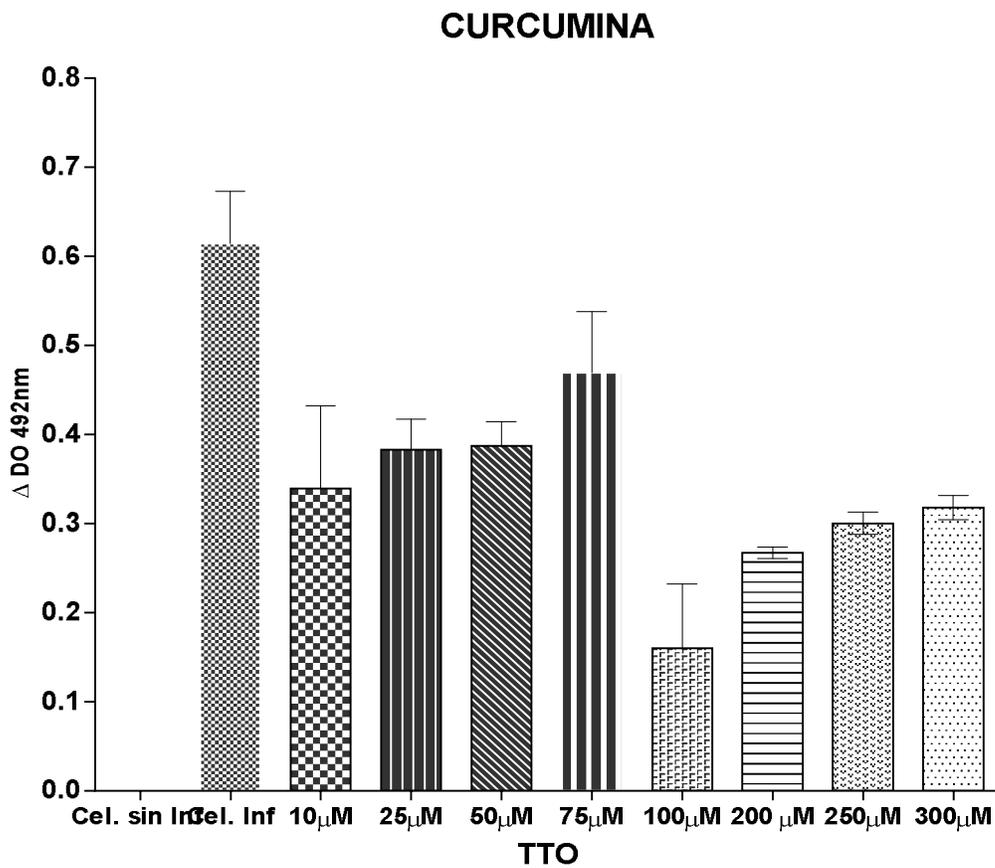
- glutathione and costimulatory signals*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **226**(3): p. 695-702.
126. Balasubramanyam, M., et al., *Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications*. *J Biosci*, 2003. **28**(6): p. 715-21.
127. Liu, J., et al., *Antioxidant activity of diethyldithiocarbamate*. *Free Radic Res*, 1996. **24**(6): p. 461-72.
128. Garcia, M.A., et al., *Activation of NF-kB pathway by virus infection requires Rb expression*. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6422.
129. Wullaert, A., K. Heyninck, and R. Beyaert, *Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(9): p. 1090-101.
130. Nakano, H., et al., *Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(5): p. 730-7.
131. Papa, S., et al., *The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(5): p. 712-29.
132. Graff, J.W., K. Ettayebi, and M.E. Hardy, *Rotavirus NSP1 inhibits NFkappaB activation by inducing proteasome-dependent degradation of beta-TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(1): p. e1000280.
133. Arnold, M.M., M. Barro, and J.T. Patton, *Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain*. *J Virol*, 2013. **87**(17): p. 9813-21.
134. Hu, L., et al., *Rotavirus non-structural proteins: structure and function*. *Curr Opin Virol*, 2012. **2**(4): p. 380-8.
135. Gac, M., J. Bigda, and T.W. Vahlenkamp, *Increased mitochondrial superoxide dismutase expression and lowered production of reactive oxygen species during rotavirus infection*. *Virology*, 2010. **404**(2): p. 293-303.
136. Hwang, C., A.J. Sinskey, and H.F. Lodish, *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum*. *Science*, 1992. **257**(5076): p. 1496-502.
137. Luo, K. and S.S. Cao, *Endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cell function and inflammatory bowel disease*. *Gastroenterol Res Pract*, 2015. **2015**: p. 328791.
138. Sharma, O.P., *Antioxidant activity of curcumin and related compounds*. *Biochem Pharmacol*, 1976. **25**(15): p. 1811-2.

139. Surh, Y.J., et al., *Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation*. *Mutat Res*, 2001. **480-481**: p. 243-68.
140. Zhu, Z., et al., *Rhinovirus stimulation of interleukin-6 in vivo and in vitro. Evidence for nuclear factor kappa B-dependent transcriptional activation*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(2): p. 421-30.
141. Kil, I.S., S.Y. Kim, and J.W. Park, *Glutathionylation regulates IkappaB*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **373**(1): p. 169-73.
142. Shin, S.W., I.S. Kil, and J.W. Park, *Silencing of mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances heat shock-induced apoptosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **366**(4): p. 1012-8.
143. Wu, M., et al., *Sustained oxidative stress inhibits NF-kappaB activation partially via inactivating the proteasome*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **46**(1): p. 62-9.
144. Nowak, D.E., et al., *RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(11): p. 3623-38.
145. Saito, Y., et al., *Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide*. *Free Radic Res*, 2006. **40**(6): p. 619-30.

13 ANEXOS.

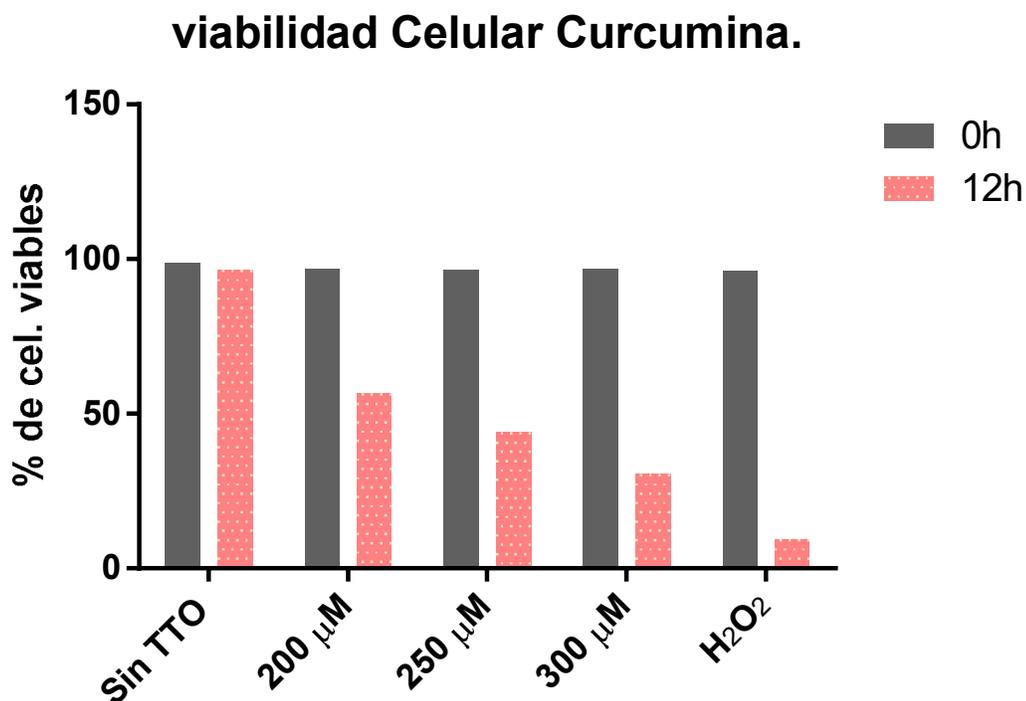
13.1 ANEXO A.

Vellosidades infectadas con rotavirus y tratadas con curcumina en diferentes concentraciones revelado con anticuerpos policlonales contra rotavirus en Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).



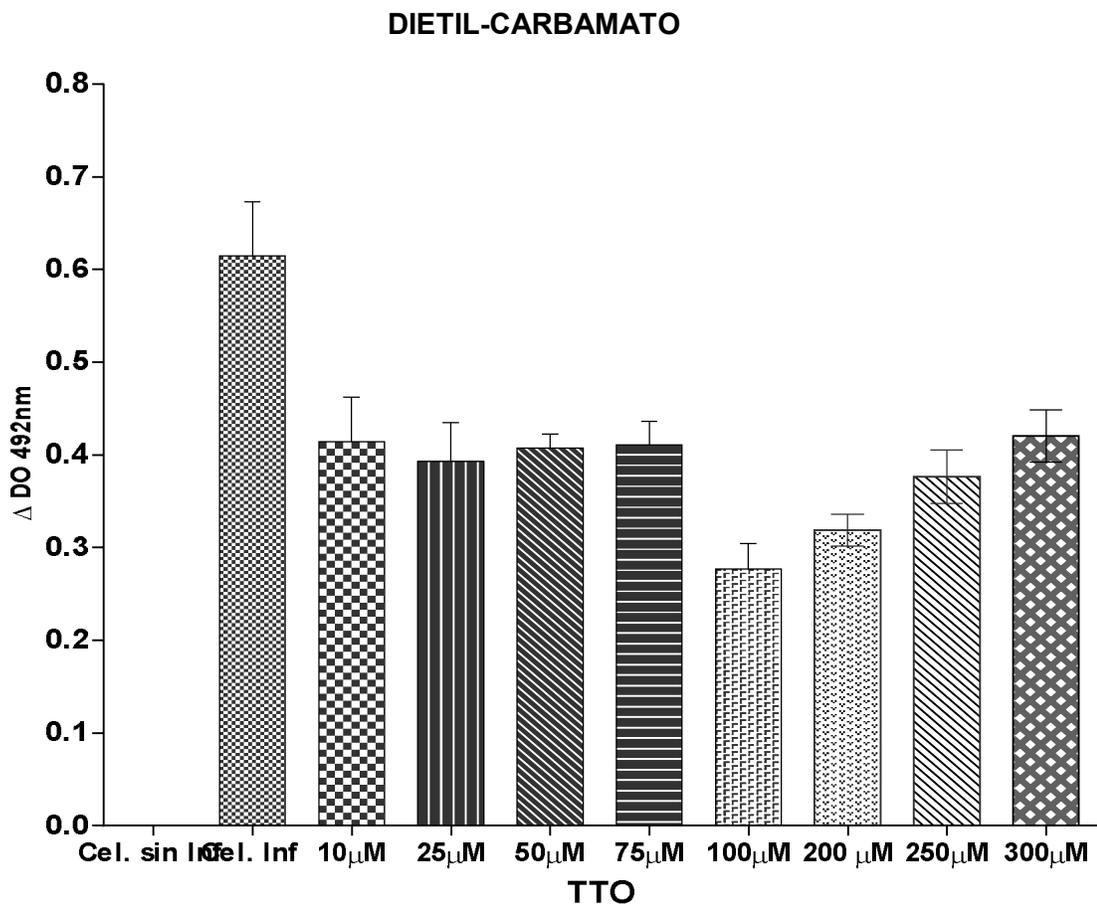
13.2 ANEXO B.

Viabilidad de vellosidades aisladas determinada por el método de exclusión con Azul Tripán. Las vellosidades previamente aisladas fueron tratadas con Curcumina a concentraciones de 200, 250 y 300 μM por ~ 12 h.p.t. a 37°C y posteriormente se adicionó el reactivo Azul Tripán en una dilución de 1:1 durante 1 minuto. Se usó como control negativo vellosidades sin ningún tratamiento y como control positivo vellosidades tratadas con H_2O_2 a 0,1mM.



13.3 ANEXO C.

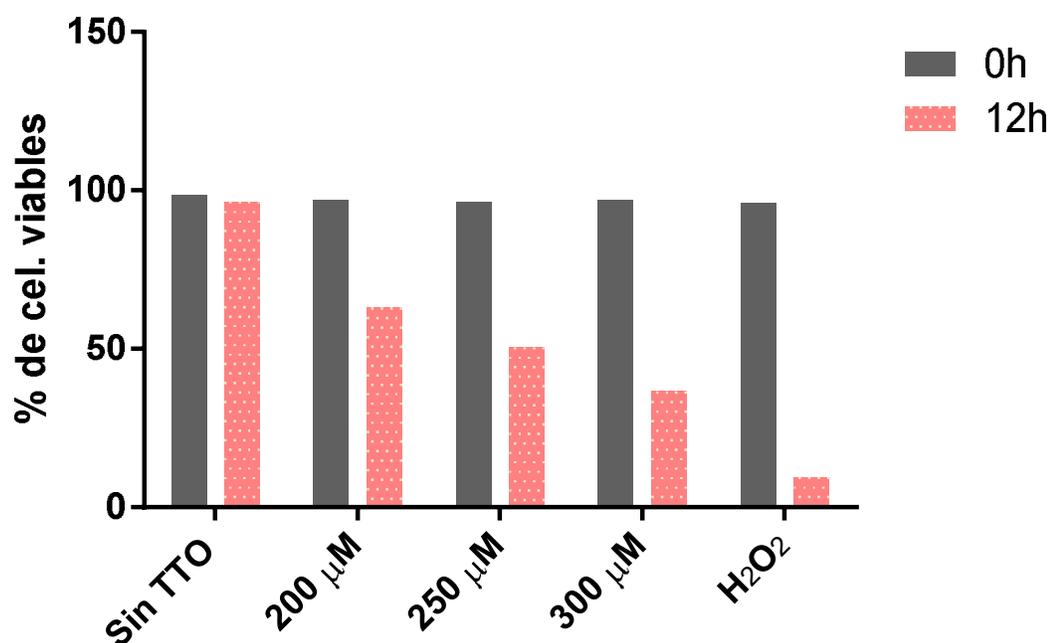
Vellosidades infectadas con rotavirus y tratadas con dietil-carbamato en diferentes concentraciones revelado con con anticuerpos policlonales contra rotavirus en Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).



13.4 ANEXO D.

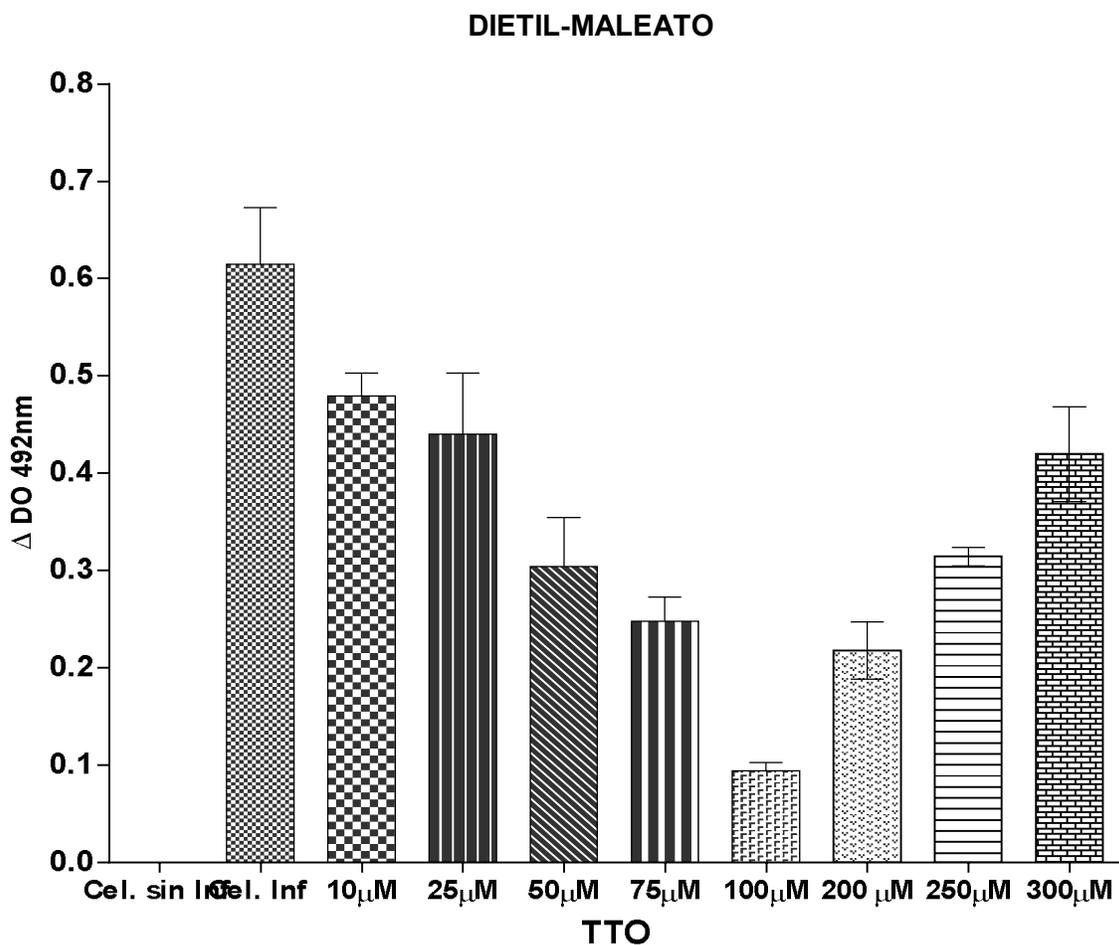
Viabilidad de vellosidades aisladas determinada por el método de exclusión con Azul Tripán. Las vellosidades previamente aisladas fueron tratadas con dietil-carbamato a concentraciones de 200, 250 y 300 μM por ~ 12 h.p.t. a 37°C y posteriormente se adicionó el reactivo Azul Tripán en una dilución de 1:1 durante 1 minuto. Se usó como control negativo vellosidades sin ningún tratamiento y como control positivo vellosidades tratadas con H_2O_2 a 0,1mM.

Viabilidad Celular Dietil-carbamato.



13.5 ANEXO E.

Vellosidades infectadas con rotavirus y tratadas con dietil-maleato en diferentes concentraciones revelado con anticuerpos policlonales contra rotavirus en Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).



13.6 ANEXO F.

Viabilidad de vellosidades aisladas determinada por el método de exclusión con Azul Tripán. Las vellosidades previamente aisladas fueron tratadas con dietil-maleato a concentraciones de 200, 250 y 300 μM por ~ 12 h.p.t. a 37°C y posteriormente se adicionó el reactivo Azul Tripán en una dilución de 1:1 durante 1 minuto. Se usó como control negativo vellosidades sin ningún tratamiento y como control positivo vellosidades tratadas con H_2O_2 a 0,1mM.

