



**POSIBLES UNIONES ENTRE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA VÍA PPAR γ –
NF κ B Y PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS**

DORY LINETH GÓMEZ MORENO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Doctorado en Biotecnología
Bogotá, Colombia
2019

**POSIBLES UNIONES ENTRE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA VÍA PPAR γ –
NF κ B Y PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS**

DORY LINETH GOMEZ MORENO

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

Director (a):
MD. MSc. PhD. Carlos Arturo Guerrero Fonseca

Línea de Investigación:
Biología Molecular de virus

Grupo de Investigación:
Laboratorio de Biología Molecular de Virus

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Doctorado en Biotecnología
Bogotá, Colombia
2019

A Dios por su infinita iluminación, protección y ayuda.

A mi familia por su inagotable apoyo y fe. Son mi principal fuente de inspiración.

A mis amigos por sus palabras de ánimo, me proveían de fuerza para terminar esta etapa.

Agradecimientos

En esta etapa del camino, nunca dejare de agradecerles a Dios y la Virgen por ser mis guías espirituales, por su iluminación, compañía y protección. A mis padres y hermana, por su paciencia, apoyo, compañía, su fe inquebrantable y sus palabras en momentos de desfallecimiento. Al doctor Carlos Arturo Guerrero Fonseca, director de tesis por su tiempo y permitirme desarrollar este trabajo en el Laboratorio de Biología Molecular de Virus; a Miguel Ospino Márquez (auxiliar de laboratorio) y compañeros por su toda su colaboración.

A mi comité tutorial doctores Eugenio Spencer Ossa y Mario Francisco Guerrero Pabón por su interés en este tema, sus aportes fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

Al programa de becas Alianza del Pacifico, a la Universidad de Chile, al Laboratorio de fisiología celular del musculo y a los doctores Enrique Jaimovich y Paola Ilanos Vidal por darme la oportunidad de realizar mi pasantía doctoral, sus enseñanzas, análisis científico y profesionalismo fueron de gran ayuda para culminar este trabajo.

Finalmente quiero agradecer especialmente a Colciencias (Colfuturo) y la Universidad Nacional de Colombia, con su programa de becas doctorales, el cual me permitió realizar mi doctorado y culminarlo con éxito.

Resumen

Rotavirus es un virus perteneciente a la familia *Reoviridae*, icosaédrico sin envoltura; su cápside está constituida por tres capas: externa, media e interna. Mide aproximadamente 70 nm de diámetro, su genoma de 11 segmentos de ARN de doble-cadena codifica para seis proteínas estructurales (VP) y seis proteínas no estructurales (NSP).

OBJETIVO GENERAL: Determinar la unión de las proteínas no estructurales de Rotavirus (NSP1-6) con proteínas de la vía PPAR γ – NF κ B.

METODOLOGÍA: Se evaluó la expresión de proteínas celulares relacionadas con las vías NF κ B y PPAR γ , mediante las técnicas de ELISA, luminiscencia, citometría de flujo y Western blot, en células MA104 infectadas con Rotavirus y/o transfectadas con cada uno de los plásmidos que expresan para proteínas NSPs. La unión entre proteínas celulares y virales (NSPs) se examinó por las técnicas de ELISA, Epi-fluorescencia y microscopia confocal.

RESULTADOS: La expresión de las proteínas p-IKK α/β , NF κ B, p-NF κ B, PPAR γ , RXR y PGC1 α aumentaron en células infectadas con rotavirus RRV y en células transfectadas con plásmidos que expresan para cada una de las NSPs se observó que la expresión de p-IKK α/β aumento en presencia de NSP3,4,5 y 6; NF κ B aumento en presencia de NSP1, 3 y 4, p-NF κ B aumento en presencia de NSP1, 2, 3, 4, 5 y 6; PPAR γ aumento en presencia de NSP1, 3, 5 y 6; RXR aumentó en presencia de NSP4, 6 y PGC1 α aumento en presencia de NSP1 y 5. Al analizar por ELISA la unión *in-vitro* con proteínas recombinantes se observó unión entre rPPAR γ y rNSP 1, 2, 3, 4 y RXR con rNSP1; cuando se estudió la unión por ELISA *in-vivo en células* infectadas y/o transfectadas con cada uno de los plásmidos que expresan proteínas celulares con las proteínas virales, se evidenció unión entre PPAR γ con NSP1, 2, 3, 4; RXR con NSP1,6; p-IKK α/β con NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6 y p-NF κ B con NSP 5, 6. Posteriormente, por microscopia confocal, se observó colocalización de RXR con NSP1; PPAR γ con NSP1 y NSP3; p-IKK α/β con NSP2 y NF κ B con NSP5.

Finalmente, cuando se analizó si la infección por rotavirus RRV afecta la activación de la vía inflamatoria; se estudió la expresión de PPAR γ a nivel citoplasmático y nuclear por Western blot, identificándose la presencia de p- PPAR γ . Adicionalmente, por ELISA *in-vivo en células*, se evaluó la unión entre PPAR γ y PGC1 α , encontrándose que solo a nivel nuclear hay unión de estas dos proteínas celulares en células infectadas con rotavirus RRV y en células transfectadas con los plásmidos que expresan para NSP2 y 4. Además, al activar la vía PPAR γ con un agonista como Tiazolinediona o inhibirla con un antagonista como GW-9662, tratando células infectadas o no y/o transfectadas con plásmidos que expresan para cada una de las proteínas NSPs, se observó que la expresión de PPAR γ disminuía en células infectadas y tratadas con Tiazolinediona y aumentaba en células infectadas y tratadas con el inhibidor GW-9662, pero cuando las células eran transfectadas con plásmidos que expresan para cada una de las proteínas NSPs y tratadas con el inhibidor GW-9662 se observó aumento de la expresión de PPAR γ

en presencia de NSP1, 5 y 6. Por otra parte, cuando se inhibió la vía NFκB con un inhibidor como curcumina, se observó que la expresión de NFκB disminuía en células infectadas y tratadas con curcumina y en células transfectadas con plásmidos que expresan para cada una de las proteínas NSPs y tratadas con curcumina se observó disminución de la expresión de NFκB en presencia de NSP2 y 4.

CONCLUSIÓN: Durante la infección por Rotavirus, la expresión de NFκB y su actividad transcripcional aumentan, se observa que RXR colocaliza con NSP1, PPARγ colocaliza con NSP1 y NSP3, p-IKKα/β colocaliza con NSP2 y NFκB colocaliza con NSP5. Adicionalmente, a nivel citoplasmático se detectó que a las 12 h.p.i. PPARγ está siendo fosforilado. Por otra parte, en el núcleo, PPARγ se encuentra unido a PGC1α, sin embargo, la actividad transcripcional disminuye.

PALABRAS CLAVES: Rotavirus, PPARγ, NFκB, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6

Abstract

POSSIBLE UNIONS BETWEEN PROTEINS RELATED TO THE PPAR γ – NF κ B PATHWAY AND NON-STRUCTURAL PROTEINS OF ROTAVIRUS

Rotavirus is a virus belonging to the family Reoviridae, icosahedral without envelope; Its capsid is made up of three layers: external, middle and internal. Measuring approximately 70nm in diameter, its 11-segment double-stranded RNA genome encodes six structural (VP) and six non-structural (NSP) proteins.

GENERAL OBJECTIVE: To determine the union of the non-structural Rotavirus proteins (NSP1-6) with proteins of the PPAR γ -NF κ B pathway.

METHODOLOGY: The expression of cellular proteins related to the NF κ B and PPAR γ pathways was evaluated, using ELISA, luminescence, flow cytometry and Western blot techniques, in MA104 cells infected with Rotavirus and / or transfected with each of the plasmids that express for NSPs proteins. The binding between cellular and viral proteins (NSPs) was examined by ELISA, Epi-fluorescence and confocal microscopy techniques.

RESULTS: The expression of the proteins p-IKK α / β , NF κ B, p-NF κ B, PPAR γ , RXR and PGC1 α increased in cells infected with rotavirus RRV and in cells transfected with plasmids expressing for each of the NSPs it was observed that the expression p-IKK α / β increase in the presence of NSP3,4,5 and 6; NF κ B increased in the presence of NSP1, 3 and 4, p-NF κ B increased in the presence of NSP1, 2, 3, 4, 5 and 6; PPAR γ increased in the presence of NSP1, 3, 5 6; RXR increased in the presence of NSP4, 6 and PGC1 α increased in the presence of NSP1 and 5. When analyzing in-vitro the binding in vitro with recombinant proteins, binding between rPPAR γ and rNSP 1, 2, 3, 4 and RXR with rNSP1 was observed; When the binding by ELISA in-vivo was studied in cells infected and / or transfected with each one of the plasmids that express cellular proteins with the viral proteins, binding between PPAR γ with NSP1, 2, 3, 4 was evident; RXR with NSP1,6; p-IKK α / β with NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6 and p-NF κ B with NSP 5, 6. Subsequently, by confocal microscopy, RXR colocalization with NSP1 was observed; PPAR γ with NSP1 and NSP3; p-IKK α / β with NSP2 and NF κ B with NSP5. Finally, when it was analyzed if the infection by rotavirus RRV affects the activation of the inflammatory pathway; The expression of PPAR γ at the cytoplasmic and nuclear level was

studied by Western blot, identifying the presence of p-PPAR γ . Additionally, by in-vivo ELISA in cells, the binding between PPAR γ and PGC1 α was evaluated, finding that only at the nuclear level there is binding of these two cellular proteins in cells infected with rotavirus RRV and in cells transfected with the plasmids that express for NSP2 and 4. Furthermore, when activating the PPAR γ pathway with an agonist such as Thiazolinedione or inhibiting it with an antagonist such as GW-9662, treating cells infected or not and / or transfected with plasmids that express for each of the NSPs proteins, it was observed that the expression PPAR γ decreased in cells infected and treated with Thiazolinedione and increased in cells infected and treated with the GW-9662 inhibitor, but when the cells were transfected with plasmids that express for each of the NSPs proteins and treated with the GW-9662 inhibitor, observed an increase in PPAR γ expression in the presence of NSP1, 5 and 6. On the other hand, when the NF κ B pathway was inhibited with an inhibitor such as curcumin, it was observed that the expression of NF κ B decreased in cells infected and treated with curcumin and in cells transfected with plasmids that express for each of the NSPs proteins and treated with curcumin, a decrease in the expression of NF κ B was observed in the presence of NSP2 and 4.

CONCLUSION: During Rotavirus infection, the expression of NF κ B and its transcriptional activity increase, it is observed that RXR collocates with NSP1, PPAR γ collocates with NSP1 and NSP3, p-IKK α / β collocates with NSP2 and NF κ B collocates with NSP5. Additionally, at the cytoplasmic level, it was detected that at 12 p.m. PPAR γ is being phosphorylated. On the other hand, in the nucleus, PPAR γ is bound to PGC1 α , however, transcriptional activity decreases.

KEY WORDS: Rotavirus, PPAR γ , NF κ B, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6

Contenido

	Pags.
Resumen	6
Abstract	8
Lista de figuras	13
Lista de Anexos	14
Introducción	15
1. Rotavirus	17
1.2 Ciclo replicativo	17
1.3 Proteínas no estructurales de rotavirus y su relación con las vías inflamatorias celulares	19
1.3.1 Proteína no estructural 1 (NSP1)	19
1.3.2 Proteína no estructural 2 Y 5 (NSP2 Y NSP5)	20
1.3.3 Proteína no estructural 3 (NSP3)	20
1.3.4 Proteína no estructural 4 (NSP4)	21
1.3.5 Proteína no estructural 6 (NSP6)	22
2. Proteínas celulares y Rotavirus	22
2.1 Vía inflamatoria- Proteína Factor Nuclear Kappa B (NFκB)	22
2.2 Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPARγ) y sus agonistas	24
2.3 Coactivador transcripcional PGC-1α	25
3. Problema	26
4. Justificación	27
5. Hipótesis	27
6. Objetivos	27
6.1 Objetivo general	27

6.2 Objetivos específicos	28
7. Materiales y métodos	28
7.1 Cepas bacterianas y medio de cultivo	28
7.2 Plásmidos	29
7.3 Transformación, mantenimiento de bacterias competentes y extracción de plásmidos	30
7.4 Expresión de proteínas recombinantes en células procariotas	31
7.5 Electroforesis SDS-PAGE y Western blot	31
7.6 Electroelución de proteínas	31
7.7 Animales e inoculación con proteínas recombinantes	32
7.8 Cepas de rotavirus, anticuerpos y reactivos	32
7.9 Transfección línea celular MA104	33
7.10 Ensayo MTT	33
7.11 Epi-fluorescencia y microscopia confocal	33
7.12 ELISA de captura y directo	34
7.13 Citometría de flujo	35
7.14 Ensayo de luciferasa	35
7.15 Estadística	35
8. Resultados	36
8.1 Curvas de crecimiento bacteriano	36
8.2 Proteínas recombinantes no estructurales de Rotavirus (NSPs) y celulares	37
8.3 Estandarización de la eficiencia de la transfección	41
8.4 Expresión de proteínas relacionadas con la vía NFκB en células MA104, transfectadas con plásmidos que expresan NSPs de Rotavirus RRV	43
8.5 Expresión de proteínas relacionadas con la vía PPARγ en células MA104, transfectadas con plásmidos que expresan NSPs de Rotavirus RRV	45

8.6 Determinación de posibles complejos entre proteínas no estructurales de Rotavirus (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 Y NSP6) y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B	47
8.7 Superposición entre proteínas no estructurales de Rotavirus (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 Y NSP6) y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B	55
8.8 Colocalización entre proteínas no estructurales de Rotavirus (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 Y NSP6) y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B	58
8.9 La infección por Rotavirus RRV afecta la expresión de PPAR γ a nivel citoplasmático y a nivel nuclear	60
9. Discusión	62
10. Perspectivas	65
10. Bibliografía	66
11. Anexos	74

Lista de Figuras

	Pags.
Figura 1. Curvas de crecimiento cepas DH5 α y BL21DE3	33
Figura 2. Curvas de crecimiento bacterias transfectadas.	36
Figura 3. Proteínas recombinantes y sueros hiperinmunes.	37
Figura 4. Estandarización de la eficiencia de la transfección.	39
Figura 5. Expresión de proteínas relacionadas con la vía NF κ B.	42
Figura 6. Expresión de proteínas relacionadas con la vía PPAR γ .	44
Figura 7. Determinación de posibles complejos entre proteínas no estructurales de rotavirus NSP1 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B.	47
Figura 8. Determinación de la unión entre NSP2 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B <i>in-vivo en células e in-vitro</i> .	48
Figura 9. Determinación de la unión entre NSP3 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B <i>in-vivo en células e in-vitro</i> .	49
Figura 10. Determinación de la unión entre NSP4 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B <i>in-vivo en células e in-vitro</i> .	50
Figura 11. Determinación de la unión entre NSP5 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B <i>in-vivo en células e in-vitro</i> .	51
Figura 12. Determinación de la unión entre NSP6 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B <i>in-vitro</i> .	52
Figura 13. Superposición entre proteínas NSPs y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B.	54
Figura 14. Colocalización entre proteínas NSPs y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B.	56
Figura 15. Expresión de PPAR γ a nivel citoplasmático y a nivel nuclear.	59

Lista de Anexos

Anexo 1. Aval ético

70

INTRODUCCIÓN

Rotavirus es un agente causal de gastroenteritis en niños menores de cinco años en todos los países del mundo y responsable de alrededor de 453 mil muertes anuales y aproximadamente 40% de las hospitalizaciones por diarrea en menores de 5 años de edad en la región de las Américas [1, 2].

Rotavirus es un virus perteneciente a la familia *Reoviridae*; una familia de virus icosaédricos sin envoltura (desnudos); en su cápside se encuentran tres capas: capa externa, media e interna. Mide aproximadamente 70 nm de diámetro, su genoma está compuesto por ARN de doble-cadena, que codifica para seis proteínas estructurales denominadas VP (VP 1 a 6) y seis no estructurales (uno de sus segmentos codifica para 2 proteínas) llamadas NSP (NSP1 a 6)[3-5].

Este virus entra a la célula huésped mediante la interacción secuencial de proteínas virales con proteínas que se encuentran en la membrana celular como proteína de choque térmico (Hsc70), integrinas, proteína disulfuro isomerasa (PDI) y monosacáridos como ácido sialico [6-10]. Para determinar el papel de la proteína PDI en el proceso de entrada del rotavirus a las células se utilizaron reactivos que interfieren con la actividad oxidoreductora de PDI, como NBT y Bacitracin o péptidos que tenían el aminoácido cisteína [118]. Inicialmente, se pensó que el grupo SH era el responsable de la interferencia en la infección. Por esta razón, se exploraron alrededor de 120 fármacos que tuviesen o no el grupo SH. Los resultados obtenidos indicaron tres grupos de fármacos no relacionados que demostraron inhibir la infección en células MA104, Caco-2 y vellosidades aisladas de ratón: 1. Oxidoreductores como vitamina C y N-acetil cisteína 2. Desinflamantes no esteroideos (AINES) 3. Agonistas de PPAR γ (pioglitazona y rosiglitazona) [11, 12].

Adicionalmente, se ha reportado que durante la infección de rotavirus, proteínas celulares como ROS, NF κ B, Cox-2, PDI, Hsc70 y PPAR γ , aumentan su expresión y que al tratar estas células con AINES o fármacos como tiazolinedionas, ácido retinoico y DHA, la expresión de estas proteínas disminuía [11]. También, se observó que al activar PPAR γ con estos fármacos disminuían el número de viriones formados [11].

Sin embargo, la relación entre las vías celulares NF κ B y PPAR γ con la infección por rotavirus no queda claro, puesto que son proteínas que activan vías opuestas. NF κ B activa la vía proinflamatoria y PPAR γ la anti-inflamatoria. Se conoce que, durante la replicación viral, las proteínas no estructurales de rotavirus influyen en distintos procesos intracelulares, con el objetivo de lograr una replicación viral exitosa. Dentro de lo que se ha investigado acerca de cada proteína no estructural, estudios indican que durante las primeras horas post-infección, la proteína no estructural 1 (NSP1) está involucrada en antagonizar la respuesta inmune celular del huésped al interferir con la inducción de interferones (IFN α/β) a través de la degradación de IRF-3, IRF-5 e IRF-7[12, 13]. La

proteína NSP1 de varias cepas de rotavirus ha demostrado que propicia la degradación de IRF3 vía proteasoma durante las primeras horas después de la infección [13-15], además, NSP1 inhibe la activación de NFκB mediante la inducción de la degradación vía proteasoma de β-TrCP[16]. Otra proteína no estructural, que interviene en procesos celulares es la proteína no estructural 3 (NSP3), la cual unida a la maquinaria de traducción celular, permite la traducción preferencial del ARNm viral. [17]. NSP3 está implicada en la inhibición de la traducción del ARNm celular mediante la unión a eIF4G [18, 19]. Por otra parte, se conoce que el estrés oxidativo hace parte de la defensa natural de las células a la infección por virus y puede también ser un mecanismo por el cual los virus provocan daño celular; la relación entre el estrés oxidativo y la infección viral no se conoce en su totalidad, al igual que los mecanismos por los cuales sus efectos sobre las funciones celulares conducen a la muerte celular [10]. Sin embargo, estudios indican que rotavirus induce un aumento de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) tras la exposición a la proteína no estructural 4 (NSP4) en el íleon murino[20]. También, NSP4 induce liberación de radicales óxido nítrico (NO) en las células epiteliales intestinales humanas incubadas con NSP4 purificado [20], NSP4 es conocida por interrumpir la homeostasis del calcio (Ca²⁺) celular por translocación al retículo endoplasmático y a la mitocondria durante la infección por rotavirus [21]. NSP4 ejerce efecto pro-apoptótico mediante la interacción con proteínas mitocondriales translocadoras de nucleótidos de adenina y canal de aniones dependiente de voltaje, lo que resulta en la disipación del potencial mitocondrial, la liberación de citocromo C de la mitocondria y la activación de caspasas. Aunque durante horas iniciales de la infección, la activación de la apoptosis por NSP4 es inhibida por la activación de las vías de supervivencia celular (PI3K / Akt)[21]. El papel de cada una de estas proteínas no estructurales y su relación con las vías celulares PPARγ-NFκB, no está totalmente caracterizado [22]. Sin embargo, la relación entre las vías celulares NFκB y PPARγ con la infección por rotavirus no queda claro, puesto que son proteínas que activan vías opuestas. NFκB activa la vía proinflamatoria y PPARγ la anti-inflamatoria. No se ha determinado si las proteínas del rotavirus están implicadas en forma directa en el aumento de la expresión de las proteínas celulares o si es una respuesta de la célula ante la infección viral. Por lo anterior, esta investigación trata de aclarar si hay una posible unión entre las proteínas de la vía celular PPARγ-NFκB con las proteínas no estructurales de Rotavirus.

1. ROTAVIRUS

Rotavirus es un virus perteneciente a la familia *Reoviridae*; es un virus icosaédricos sin envoltura; en su cápside se encuentran tres capas: capa externa, media e interna. Su genoma está compuesto de 11 segmentos de ARN de doble-hebra, que codifican seis proteínas estructurales denominadas VP (VP 1 a 6) y seis proteínas no estructurales (uno de sus segmentos codifica para 2 proteínas) llamadas NSP (NSP1 a 6)[3-5].

El virión maduro denominado TLP (partícula triple capa) está compuesto por tres capas concéntricas de proteínas que engloban al genoma viral. La capa más interna del virión está formada por 60 dímeros de la proteína VP2, que rodea al genoma del virión y de pequeñas cantidades de la RNA polimerasa VP1 y de la guanililtransferasa VP3. Doscientos sesenta trímeros de VP6, la proteína más abundante del virión, constituyen la capa intermedia. La capa más externa está formada por dos proteínas, VP4 y VP7. La superficie lisa del virus está compuesta por 780 copias de la glicoproteína VP7, organizada en forma de trímeros, mientras que 60 espículas, formadas por VP4, se proyectan hacia el exterior de la superficie viral[5]. La proteína VP4 tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del virus, incluyendo la unión al receptor y la penetración a la célula que infecta; por lo tanto, las propiedades de esta proteína son determinantes importantes del rango de huésped, virulencia, tropismo, e inducción de inmunidad protectora[5]. El papel de VP7 durante las primeras interacciones del virus con la célula no es muy claro, aunque se ha demostrado que esta proteína interactúa con la superficie celular en eventos posteriores a la unión inicial[23].

Además de las proteínas estructurales, se han identificado seis proteínas no estructurales (NSP1-6). NSP1 es una proteína no estructural encargada de inhibir la respuesta inmune de la célula hospedadora, NSP2, NSP5 y NSP6 es una proteína que se acumula en inclusiones citoplasmáticas llamadas viroplasmos y es necesaria en la replicación del genoma, NSP3 está unida al mARN en las células infectadas y es la responsable de la síntesis de proteínas virales, NSP4 es una enterotoxina viral que induce diarrea y glicoproteína transmembranal en el retículo endoplásmico rugoso y mitocondria [24].

1.2 CICLO REPLICATIVO DE ROTAVIRUS

Después de unirse a la superficie de la célula, el virus penetra la membrana plasmática y esta penetración se incrementa al tratar el virus con tripsina, que corta la proteína VP4 en dos polipéptidos llamados VP8 y VP5[25]. 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[7, 26]. 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[27, 28]. Aparentemente, la entrada a la célula huésped es un proceso

que involucra diferentes dominios de las proteínas de la capsula externa del virus, con varios receptores celulares como las integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y a la proteína Hsc70[27] y PDI[9]. Además de estas proteínas, investigaciones han concluido que las balsas lipídicas (microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos) tienen un papel importante en la infección y entrada del virus[29, 30]. 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[8]. 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[31].

En el proceso de entrada del virus a la célula se ha encontrado que los rotavirus son dependientes de ácido siálico (AS), e inicialmente interacciona y el dominio VP8[23, 32]. Varias investigaciones han encontrado que este virus se une a la superficie celular por interacción con la integrina $\alpha 2\beta 1$ [7]. Después del contacto inicial del rotavirus con AS y la integrina $\alpha 2\beta$, el virus interactúa con otras proteínas de la célula huésped: Hsc70- $\alpha v\beta 3$ -PDI y $\alpha x\beta 2$. La interacción viral con Hsc70 es mediada por un dominio en VP5[33-35]

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 mARN 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 mARN) y da lugar al ARN de doble cadena (dsARN) que constituye el genoma viral [5].

Una vez hay acumulación de proteínas virales [132], después de la infección, se forman en el citoplasma celular estructuras electrodensas llamadas viroplasmos, en donde se ha propuesto que se lleva a cabo la replicación del genoma viral. En estas estructuras también se ensamblan las partículas de doble capa que posteriormente geman al interior del retículo endoplásmico y adquieren durante este proceso la tercera capa proteica, dando lugar a la partícula madura. Las proteínas NSP2, NSP5 y NSP6 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[29].

Poco tiempo después de su entrada, el virus toma control de la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula, de modo que la mayoría de las proteínas que son sintetizadas durante la infección son las proteínas virales y la síntesis de proteína celular se ve desplazada. Los mARNs virales tienen una estructura Cap- en el extremo 5', pero a diferencia de la mayoría de los mARNs 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, se cree que estas secuencias, contienen señales importantes para la transcripción, replicación y posible ensamblaje viral [5].

Los ARNs recién sintetizados cumplen dos funciones: como ARNs mensajeros que dirigen la traducción de las proteínas del virus y como plantillas para la síntesis de los ARNs

complementarios para la replicación del genoma. La selección, el empaquetamiento y la replicación de los segmentos del genoma, así como la morfogénesis de las partículas de doble capa (DLPs), se llevan a cabo en estructuras electrodensas denominadas viroplasmatas, que están compuestas por ARN y proteínas virales. Estos DLPs presentes en los viroplasmatas (que se encuentran alrededor del RE), geman hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE) y la proteína NSP4 funciona como receptor de la DLP en la membrana del RE y favoreciendo su gemación; durante este proceso, las DLPs adquieren una membrana lipídica transitoria que contiene NSP4/ VP7/ VP4. Finalmente, las partículas envueltas pierden la membrana lipídica, NSP4 se disocia y la capa externa, formada por VP4 y VP7, adquiere su conformación final. Aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo este último paso en la morfogénesis no está claro [36, 37]. Una vez las partículas han madurado, son liberadas al exterior de la célula mediante evaginación a través de la membrana del retículo endoplasmático, donde adquieren las proteínas de la cápsida más externas. Finalmente los viriones maduros son liberados de la célula por lisis[4]. Todo el ciclo replicativo de los rotavirus se lleva a cabo en el citoplasma celular, sin necesitar el núcleo de la célula[4].

1.3 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS Y SU RELACIÓN CON LAS VÍAS INFLAMATORIAS CELULARES

1.3.1 PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL 1 (NSP1)

La proteína no estructural 1 (NSP1) codificada por el segmento 5, el cual tiene una longitud de 1611 nucleótidos y un solo marco de lectura de 1485 nucleótidos. La proteína está conformada por 485 a 495 aminoácidos con un peso molecular de 58,484 KDa. En el extremo amino-terminal tiene un motivo altamente conservado entre los aminoácidos 37-81, rico en residuos de cisteínas e histidinas.[38-40].

Varios estudios han observado que durante el ciclo replicativo viral NSP1 interacciona con diferentes proteínas con el fin de evadir la respuesta inmune celular. La proteína NSP1 induce la degradación vía proteasoma de factores reguladores de interferón como IRF3, IRF5 e IRF7, lo cual inhibe la respuesta antiviral y secreción de IFN- β [12, 14-16]. Por otra parte, NSP1 también puede unirse a la proteína que contiene repeticiones β -transduccina (β -TrCP), estimulando su degradación y estabilizando la represión de I κ B α sobre NF κ B y de esta manera subvertir la inducción de IFN[16].

Adicionalmente se ha reportado que NSP1 inhibe la translocación nuclear de STAT 1 y STAT 2, previniendo la expresión de genes estimulantes de IFN[41]. NSP1 también puede regular la apoptosis por medio de la activación de vías celulares pro-supervivencia como PI3K/Akt durante las primeras horas post-infección (2 a 8 h.p.i.) [42].

1.3.2 PROTEINA NO ESTRUCTURAL 2 Y 5 (NSP2 Y NSP5)

La proteína no estructural 2 (NSP2) de 35 kDa, codificada por el segmento 8; se expresa en altos niveles en células infectadas por rotavirus. Estudios de inmunofluorescencia han demostrado que se acumula en viroplasmias (inclusiones electro-densas citoplasmáticas que aparecen 2 a 3 horas post-infección) [43], dentro de sus características se ha observado que forma homomultímeros conformados de 4 a 8 subunidades, los cuales tienen la capacidad de unirse al RNA de cadena simple y tener actividad nucleosido trifosfatasa (NTPasa) [44], por otra parte se ha detectado que durante la replicación viral puede ser fosforilada, aunque dicha acción es transitoria en células MA104; estas características sugieren que NSP2 podría estar funcionando como un catalizador del empaquetamiento de RNA mensajero viral durante la replicación a través de la energía derivada de su actividad NTPasa [45].

La proteína no estructural 5 (NSP5) de 26 a 28kDa, codificada por el segmento 11; posee un alto contenido de serina, Treonina y lisina en su extremo C-terminal. Post-transcripcionalmente es modificada por O-glicosilación y por su capacidad de fosforilarse se han identificado varios isómeros de 32-34 kDa [46]

En células infectadas NSP2 y NSP5 se localizan en el viroplasma junto con otras proteínas como VP1, VP2 y VP3; NSP2 y NSP5 interactúan entre sí, activando la hiperfosforilación de NSP5 [47, 48] y la formación de estructuras tipo viroplasma[49].

Se ha observado que rotavirus como un mecanismo para contrarrestar la respuesta inmune del huésped, en algunas cepas como OSU, NCDV y A5-16 (cepa que no codifica NSP1), puede acumular la subunidad p65 de la proteína NFκB en el viroplasma, en donde colocaliza con NSP2 y VP6, lo cual evita que dicha proteína sea trasladada al núcleo, esto sugiere que el secuestro de p65 en el citoplasma inhiba la activación de NFκB y que dicha acumulación citoplasmática depende de la eficiencia de formación del viroplasma en las células infectadas [16].

1.3.3 PROTEINA NO ESTRUCTURAL 3 (NSP3)

Proteína no estructural 3 (NSP3) de 36 kDa, codificada por el segmento 7; es una proteína homodimérica de unión al RNA[50], está compuesta por dos dominios, un dominio N-terminal unida a una secuencia consenso (5'-GUGACC-3') en el extremo 3'[51], la cual sirve como un análogo funcional de PABP (Proteína de unión Poli-A) [22] y el dominio C-terminal el cual compite con PABP por el mismo segmento de eIF4G[18].

Los mRNA virales tienen regiones no traducidas (UTR) de longitud variable y están flanqueados por dos secuencias diferentes comunes a todos los genes. En los rotavirus del grupo A, el extremo 3' posee una secuencia consenso UGACC la cual está altamente conservada entre los 11 genes [52]. En células infectadas, se ha demostrado que NSP3 se une a los once ARN mensajeros virales, protegiéndolos de la digestión por ARNsas

[53]. Rotavirus utiliza la maquinaria de la célula huésped para producir proteínas virales codificadas en su genoma [22]. NSP3 facilita la traducción de ARNm de rotavirus a través del antagonismo con la proteína PABP [52], NSP3 interactúa con eIF4G en la misma región donde los hace con PABP [54], como consecuencia se afecta la traducción del mRNA poliadenilado y se conduce a la desconexión de la traducción del mRNA celular [18].

Sin embargo, se ha observado que cuando se silencia a NSP3 la maquinaria de síntesis de proteínas celulares puede traducir de manera eficiente ambos mRNA celulares y virales, sin ningún detrimento aparente de la síntesis de proteínas virales, esto sugiere que NSP3 no es esencial para la traducción del mRNA viral ni para la replicación viral en cultivo celular [55]; no obstante, se ha reportado que el segmento 7 que codifica para NSP3 puede estar implicado en la capacidad de propagación extra intestinal del virus [56]. Actualmente no se ha estudiado si la proteína NSP3 tiene o no algún tipo de relación con la vía inflamatoria NFκB o la vía antiinflamatoria PPARγ.

1.3.4 PROTEINA NO ESTRUCTURAL 4 (NSP4)

Proteína no estructural 4 (NSP4) de 20 a 28kDa [57], codificada por el segmento 10, es una glicoproteína transmembranal de 175 aminoácidos. NSP4 sirve como un receptor intracelular para las nuevas partículas de virus formadas que son trasladadas a través del retículo endoplásmico rugoso (RER) [58]. NSP4 tiene capacidad desestabilizadora de la membrana debido a su dominio viroporina por el cual puede crear un poro acuoso transmembranal en el RER e incrementa la concentración de calcio citoplasmático [59, 60].

En etapas tardías de la infección, NSP4 se localiza en la mitocondria, interactuando con proteínas mitocondriales como canal aniónico sensible a potencial (VDAC) ubicada en la membrana externa mitocondrial y transportador de nucleótidos de Adenina (ANT) ubicada en la membrana interna, lo cual conduce a la inducción de estímulos pro-apoptóticos, que estaba siendo contrarrestado en etapas tempranas de la infección por NSP1 [21].

Por otra parte, se ha demostrado que la infección por rotavirus induce estrés celular porque en el retículo endoplásmico produce alteraciones en la homeostasis de calcio y generación de ROS. Se ha reportado que durante la infección hay secreción de cloruro dependiente de NSP4 en enterocitos humanos [61] y en células Caco-2 infectadas con rotavirus SA11[62]. En este caso, la secreción de cloruro dependiente de NSP4 se asoció con aumento de ROS y disminución reducida del sistema glutatión (GSH/GSSG). Se observaron los mismos efectos cuando células Caco-2 fueron tratadas con NSP4 purificada, sin embargo, el aumento de ROS y el desequilibrio GSH fueron fuertemente inhibidas por tratamiento con N-acetilcisteína[62].

Actualmente no se ha estudiado si la proteína NSP4 tiene o no algún tipo de relación con la vía inflamatoria NFκB o la vía antiinflamatoria PPARγ.

1.3.5 PROTEINA NO ESTRUCTURAL 6 (NSP6)

La proteína no estructural 6 (NSP6) de 12kDa, codificada por el segmento 11. Es la proteína menos estudiada de todas [22]. Estudios de doble híbrido han demostrado que NSP6 interactúa con NSP5, lo que sugiere que posiblemente podría ser un regulador de NSP5 en el viroplasma [63]. Esta proteína es totalmente degradada dentro de las dos horas de la síntesis [64].

En diversas especies de Rotavirus A, NSP6 se localiza en la mitocondria mediante secuencias conservadas en el dominio N-terminal, lo cual sugiere que NSP6 puede afectar las funciones de la mitocondria durante la infección viral [65]. Actualmente no se ha estudiado si la proteína NSP6 tiene o no algún tipo de relación con la vía inflamatoria NFκB o la vía antiinflamatoria PPARγ.

2. PROTEÍNAS CELULARES Y ROTAVIRUS

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

Rotavirus es totalmente dependiente de la maquinaria de traducción del huésped para producir proteínas virales necesarias para su replicación. Él toma el control de los ribosomas del huésped, factores de traducción y vías de señalización implicadas en la síntesis de proteínas. Este control asegura la producción de proteínas codificadas por el virus y la inhibición de las defensas innatas celulares[66]. Estudios han demostrado que la infección por rotavirus ECwt en ratones induce proteínas celulares como Cox-2, ERp57, Hsc70, NFκB, Hsp70, PDI y PPARγ en vellosidades intestinales, mientras que el tratamiento con un medicamento antioxidante como N-acetilcisteína (NAC) en células infectadas reduce los niveles de Hsc70 y PDI similares a los observados en las vellosidades de los ratones control no infectadas[67]. El aumento de la expresión de proteínas celulares asociadas al proceso infeccioso viral agrega evidencia que sugiere que la infección por rotavirus induce estrés oxidativo y activación de la señalización pro-inflamatoria en vellosidades de ratones infectados con rotavirus ya que el tratamiento con NAC, AINEs o agonistas PPARγ reducen significativamente la infección[67].

2.1 VÍA INFLAMATORIA- PROTEÍNA FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NFκB)

NFκB (Factor Nuclear kappa B) es un factor de transcripción que juega un papel importante en el sistema inmunológico[68-70]. NFκB regula la expresión de citoquinas, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclo-oxigenasa 2 (Cox-2), factores de crecimiento,

inhibidores de la apoptosis y las enzimas efectoras en respuesta a un ligando de los receptores involucrados en la inmunidad incluidos los receptores de células T (TCR) de células B (BCR receptores) y miembros de la familia Toll-like receptor del receptor/IL-1. NFκB también juega un papel en el desarrollo y la actividad de un número de tejidos, incluyendo el sistema nervioso central [71].

Estructuralmente, NFκB es un complejo homo o heterodimérico, que puede estar compuesto por varias subunidades proteicas denominadas p50, p65, p52, c-Rel y RelB.[72, 73]. Las subunidades p65, c-Rel y RelB se sintetizan como tales, las subunidades p50 y p52 se originan como grandes proteínas precursoras (p105 y p100, respectivamente). La p50 se origina por procesamiento constitutivo a partir de la p105 y la p52 se forma a partir de la p100, en un proceso complejo que implica pasos de fosforilación y ubiquitinización [73].

NFκB es un factor de transcripción altamente regulado. Así sus subunidades aparecen retenidas en el citoplasma celular por proteínas de la familia I-κB (proteínas inhibidoras de NFκB), con 7 miembros denominados I-κBα, I-κBβ, I-κBε, I-κBγ, I-κBNS y los precursores p100 y p105[68]. I-κBβ sólo aparece en el citosol, IκB-α pueda encontrarse en el núcleo formando complejos NFκB/IκBα. Clásicamente, la “activación canónica” de NFκB en respuesta a citoquinas proinflamatorias, mitógenos o proteínas virales, presenta un punto crítico: la activación del llamado complejo quinasa de IκB (IKK), que fosforila a I-κB en residuos de serina[68]. I-κB fosforilada es reconocida por la proteína β-TrCp, que la acopla a una ubiquitina ligasa específica perteneciente a la familia SCF, para que ésta lleve a cabo su poliubiquitinización en residuos de lisina[74]. Una vez ubiquitinado, I-κB es degradado por la subunidad 26S del proteasoma. De esta forma, NFκB libre se puede translocar al núcleo, unirse a elementos específicos en el ADN, y activar la transcripción génica. El complejo IKK está constituido por tres subunidades asociadas íntimamente, dos de ellas catalíticas IKK-α e IKK-β, y otra reguladora, NEMO. La activación de ambas IKK depende de su capacidad para dimerizar y de que sean fosforiladas en serina. De las tres subunidades, IKK-β y NEMO parecen ser esenciales para el funcionamiento del complejo[75].

Varios estudios han revelado diferentes estrategias usadas por rotavirus para evadir la respuesta inmune celular. La proteína NSP1 induce la degradación vía proteosoma de factores reguladores de interferón como IRF3, IRF5 e IRF7, lo cual inhibe la respuesta antiviral y secreción de IFN-β[12, 14-16]. Por otra parte, NSP1 también puede unirse a la proteína que contiene repeticiones β-transduccina (β-TrCP), estimulando su degradación y estabilizando la represión de IκBα sobre NFκB y de esta manera subvertir la inducción de IFN[16].

Adicionalmente se ha reportado que NSP1 inhibe la translocación nuclear de STAT 1 y STAT 2, previniendo la expresión de genes estimulantes de IFN[41]. NSP1 también puede regular la apoptosis por medio de la activación de vías celulares pro-supervivencia como PI3K/Akt durante las primeras horas post-infección (2 a 8 h.p.i.) [42].

2.2 RECEPTOR GAMMA ACTIVADO POR PROLIFERADOR DE PEROXISOMA (PPAR γ) Y SUS AGONISTAS

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[76]. PPAR γ 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 [77].

La proteína PPAR γ se encuentra ampliamente expresada en el organismo, incluyendo el tejido adiposo, vascular, cardiaco y el sistema inmune. Existen además otras isoformas de PPAR codificadas por diferentes genes: PPAR α , PPAR β/δ los cuales junto con PPAR γ han surgido como blanco terapéutico de diversos desordenes inflamatorios [77].

La activación de los distintos PPARs por sus respectivos ligandos resulta en la formación de heterodímeros con otro receptor nuclear y de esta forma activan o suprimen diversos patrones de expresión génica, aunque los mecanismos involucrados aún permanecen desconocidos[78]. Los ligandos de PPAR γ incluyen al metabolito natural 15-deoxy- Δ 12,14 Prostaglandina J2[79], ácidos grasos poliinsaturados, fármacos antiinflamatorios no esteroideos[80] y ligandos sintéticos como los miembros de la familia de tiazolidinedionas (TZD)[81]. 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 que la unión de TZDs a PPAR γ ejerce efectos anti-inflamatorios y posiblemente cardioprotectores [82, 83].

Los receptores PPAR regulan la transcripción de genes por dos mecanismos: transactivación (ADN-dependiente) y transrepresión (ADN independiente), siendo este último mecanismo el que explicaría la acción antiinflamatoria de los agonistas PPAR. La transactivación de los receptores nucleares PPAR γ regula la transcripción de una serie de genes sensibles a la insulina implicados en el control del metabolismo de la glucosa y los lípidos. Esta transcripción continúa con la aparición de proteínas que influyen en los procesos biológicos, que en el caso de la pioglitazona serían la captación de la glucosa y su utilización en los órganos periféricos, la producción hepática de glucosa, lipólisis y adipogénesis. Aunque el tejido adiposo sólo hace uso del 10% del total de la glucosa que se utiliza gracias a la acción de la insulina, tiene un papel importante en el metabolismo sistémico de la glucosa. Los receptores PPAR γ son esenciales para la diferenciación y proliferación adipocitaria, así como para la captación y almacenamiento de ácidos grasos libres (AGL) por parte del tejido adiposo y se expresan principalmente en el mismo (PPAR γ -1, PPAR γ -2 y PPAR γ -3), mientras que su concentración en miocitos es menor (básicamente PPAR γ -1), por lo que la mejora de la captación de glucosa por parte de las células musculares podría ser en gran medida un efecto indirecto debido a la interacción de TZD con los adipocitos. Entre los mediadores secretados por los adipocitos maduros que podrían estar involucrados en la conexión entre músculo y grasa se encuentran la leptina, AGL, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), adiponectina y resistina[84, 85].

Existen reportes proponiendo modular la expresión de PPAR γ para disminuir la respuesta inflamatoria a virus como influenza, en virtud del papel antagonista de la actividad de la vía NF κ B, AP1 y STAT[86]. Igualmente, se conoce que PPAR α y PPAR γ regulan la respuesta inflamatoria *in vivo* e *in vitro* porque inhiben la activación de NF κ B[20, 87].

Investigaciones indican que la producción de óxido nítrico (NO) es importante en la infección de rotavirus[20]; se señala que la proteína no estructural de rotavirus, NSP4, provoca un incremento de la secreción de NO en células epiteliales humanas HT-29. Igualmente, se reporta un aumento en la concentración de los productos derivados del NO en la orina de los animales infectados con rotavirus, con la participación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el modelo murino. Existen reportes que indican que los agonistas de PPAR γ reducen la producción de NO y la actividad de la vía NF κ B[88].

Además, agonistas de PPAR- γ se han destacado como posibles herramientas terapéuticas debido a su capacidad para regular a la baja la respuesta inflamatoria respiratoria relacionada con el virus pulmonar [89]. PPAR participa como antagonista de las vías inflamatorias tales como NF κ B, AP1 y STAT [90, 91]. La regulación de estas vías de señalización por tiazolidina-2-4-dionas (TZD), incluyendo la pioglitazona y rosiglitazona, ha llevado a la reducción de los niveles de los productos de oxidación en monocitos y macrófagos [92]. PPAR ha surgido como un gen anti-inflamatorio y antioxidante que puede modular directamente la expresión de varios genes antioxidantes y pro-oxidantes en respuesta al estrés oxidativo [93-95]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los oxidantes tales como ROS podrían interactuar con la vía de señalización NF κ B de muchas maneras. La transcripción de los genes en función de NF κ B influye en los niveles de ROS, y a su vez, los niveles de ROS también a regular los niveles de actividad de NF κ B[96].

2.3 COACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL PGC-1 α

PGC-1 α es un coactivador transcripcional que regula los genes implicados en el metabolismo energético. PGC-1 α es un regulador de la biogénesis y la función mitocondrial[97]. Esta proteína interactúa con el receptor nuclear PPAR γ , que permite la interacción de esta proteína con múltiples factores de transcripción. Esta proteína puede interactuar y regular las actividades de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y los factores respiratorios nucleares (RNFs). Proporciona un vínculo directo entre los estímulos fisiológicos externos y la regulación de la biogénesis mitocondrial. Esta proteína puede participar en el control de la presión arterial, la regulación de la homeostasis de colesterol celular y el desarrollo de la obesidad.

PGC-1 α se piensa que es un integrador maestro de señales externas. Se sabe que es activado por una serie de factores, incluyendo: Especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), ambos formados endógenamente en la célula

como subproductos del metabolismo, pero sobre-expresados durante momentos de estrés celular[98].

PGC-1 α ha demostrado recientemente ejercer circuitos de retroalimentación positivos en algunos de sus reguladores corriente arriba: Niveles de PGC-1 α aumenta Akt (PKB) y Akt fosforilado (Ser 473 y Thr 308) en el músculo. [8] PGC-1 α conduce a la activación de la calcineurina[99]. Akt y la calcineurina son ambos activadores de NF κ B (p65)[100, 101]. El aumento de la actividad de NF κ B en el músculo se ha demostrado recientemente tras la inducción de PGC- 1 α [102]. El hallazgo parece ser controversial. Otros grupos encontraron que PGC-1 inhiben la actividad de NF κ B[103].

3. PROBLEMA

Durante la infección por rotavirus, se sabe que NSP1 contrarresta la respuesta inmune del huésped durante las primeras horas post-infección, evitando la activación de vías inflamatorias y pro-apoptóticas [12, 16, 22, 42], mientras NSP2, NSP5 y NSP6 forman el viroplasma, lugar en donde se lleva a cabo la replicación y ensamblaje de nuevas partículas virales [106-108]. Por otra parte, NSP3 retrasa la síntesis de la proteína del huésped PABP (Proteína de unión poli-A) y facilita la traducción del ARN mensajero rotaviral [18, 51]. Por último, NSP4 puede interrumpir la homeostasis de Ca²⁺ celular por translocación al retículo endoplasmático y a la mitocondria [109, 110]. También ejerce un efecto pro-apoptótico mediante la interacción con proteínas mitocondriales translocadoras de nucleótidos de adenina y canal de aniones dependiente de voltaje, lo que resulta en la disipación del potencial mitocondrial, la liberación de citocromo C de la mitocondria y la activación de caspasas.[21].

En nuestro laboratorio se han obtenido resultados indicando que la infección por rotavirus favorece la activación de vías proinflamatorias, se genera un ambiente oxidativo en la célula y al suministrar fármacos con capacidad antioxidante o que activen vías antiinflamatorias, disminuye la infección viral [11, 12, 105]. Igualmente, el laboratorio ha reportado que durante la infección de rotavirus, las proteínas celulares como NF κ B, Cox-2, PDI, Hsc70 y PPAR γ , aumentan su expresión, al igual que ROS y que al tratar estas células con fármacos inhibidores de la vía NF κ B o de la vía PPAR γ , como tiazolinedionas, ácido retinoico y DHA, la expresión de estas proteínas disminuía [13] También, se observó que al activar PPAR γ con estos fármacos disminuían el número de viriones formados [13].

Sin embargo, no queda claro por qué se aumenta la expresión de dos proteínas implicadas en vías antagónicas, puesto que NF κ B actúa sobre la vía proinflamatoria, mientras PPAR γ actúa sobre la inhibitoria de la inflamación. Tampoco se ha aclarado si las proteínas del rotavirus se relacionan de manera directa con el aumento de estas dos proteínas celulares o si es una respuesta de la célula ante la infección viral. Si las proteínas del rotavirus inciden en la expresión, las que tienen mayor probabilidad de

interacción son las proteínas no estructurales, puesto que participan en diferentes procesos celulares.

4. JUSTIFICACIÓN

La infección por rotavirus favorece la activación de vías proinflamatorias y la generación de un ambiente oxidativo en la célula, de tal manera que al suministrar fármacos con capacidad antioxidante o que activen vías antiinflamatorias, disminuye la infección viral [67, 104, 105]. Se utilizaron fármacos como N-acetilcisteína, vitamina C, antiinflamatorios y agonistas de PPAR γ (pioglitazona y rosiglitazona), los cuales demostraron inhibir la infección en células MA104, Caco-2 y vellosidades aisladas de ratón [67, 104].

Adicionalmente, se ha reportado que durante la infección de rotavirus, proteínas celulares como ROS, NF κ B, Cox-2, PDI, Hsc70 y PPAR γ , aumentan su expresión y que al tratar estas células con fármacos como tiazolinedionas, ácido retinoico y DHA, la expresión de estas proteínas disminuía [11]. También, se observó que al activar PPAR γ con estos fármacos disminuían el número de viriones formados [11].

Sin embargo, la relación entre las vías celulares NF κ B y PPAR γ con la infección por rotavirus no queda claro. Esta investigación trata de aclarar si las proteínas del rotavirus inciden en la expresión de NF κ B y PPAR γ , específicamente si hay interacción entre proteínas de la vía celular PPAR γ -NF κ B con las proteínas no estructurales de Rotavirus. Igualmente, tratar de explicar el aumento en la expresión de las dos proteínas implicadas en dos eventos antagónicos.

5. HIPÓTESIS

Proteínas no estructurales de rotavirus (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) se unen y activan vías inflamatorias como NF κ B y anti-inflamatorias como PPAR γ .

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar posibles complejos entre proteínas no estructurales de Rotavirus (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5 y NSP6) con proteínas de la vía PPAR γ – NF κ B en células MA104.

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la expresión de las proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B y su colocalización con proteínas no estructurales de rotavirus.
2. Determinar posibles complejos entre proteínas no estructurales de Rotavirus (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6) y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B *in-vitro* e *in-vivo* en células.
3. Identificar cambios en la expresión del promotor de NF κ B (NF κ B-luc) y del elemento de respuesta PPAR (PPRE-luc) al transfectar proteínas no estructurales de rotavirus.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIO DE CULTIVO

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas fueron: XL-1BLUE, DH5 α y BL21 (DE3), para la amplificación de plásmidos y expresión de proteínas.

Cepa XL-1BLUE. Se caracteriza por ser deficiente en endonucleasa (*endA*), enzimas de recombinación (*recA*), mejora de la estabilidad de inserción y presenta la mutación en el gen *hsdR*, la cual previene el corte del ADN clonado por el sistema de endonucleasa *EcoK*, lo que asegura la correcta y eficiente amplificación de los vectores. El gen *lacI^qZ Δ M15* en el episoma F permite la detección de color azul-blanco.

Cepa bacteriana BL21 (DE3). Es una cepa deficiente en la expresión de proteasas OmpT (proteasa extracelular) y Lon (proteasas intracelular). Presenta una secuencia que codifica la RNA polimeraza T7 del fago λ DE3 y su expresión es dependiente del promotor *lacUV5* y del represor *LacI9*.

Cepa DH5 α . Se caracteriza por tener las siguientes mutaciones: *dlacZ* Delta M15 Delta (*lacZYA-argF*) U169 *recA1* *endA1* *hsdR17* (rk-mK +) *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* [111]. Las cepas bacterianas fueron donadas por el doctor Carlos Arias del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Estas bacterias fueron crecidas en caldo o agar Luria-Bertani (LB), (10 gramos de triptona, 5 gramos de extracto de levadura, 10 gramos de cloruro de sodio (NaCl), pH de 7,5 – 8,0).

7.2 PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados fueron: Expresión en procariotas: pGST-PPARgamma (ID.16549), RXRG (ID.25500), pGST-RXRalpha (ID. 16547) y pGEX-PGC1 (1-400) (ID.1029), plásmidos comprados en Addgene, Cambridge, MA 02139, USA; pET-28a/NSP2, pET-28a/NSP3, pET-28c/NSP4 y pET-28a/NSP5, pGEM 3Z NSP1, pGEM 3Z NSP2, pGEM 3Z NSP3 y pGEM 3Z NSP4 donados por la Doctora Susana López y el Doctor Carlos Arias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estos tienen como marcador de selección resistencia a ampicilina o kanamicina y serán utilizados para expresar la proteína correspondiente.

Expresión en Eucariotas: pcDNA flag PPAR gamma (ID.8895), p50 cFlag pcDNA3 (20018), pcDNA flag PGC1 (180-797) (ID.8943), pCR-Flag-IKKalpha (ID.15467), pCMX Ikb alpha M (ID.12329), pHAGE NFkB-TA-LUC-UBC-GFP-W (ID.49343), pcDNA4 myc PGC-1 alpha (10974) (plásmidos comprados en Addgene, Cambridge, MA 02139, USA), plásmido vacío pc DNA 3.1 Hygro, donado por la Doctora Susana López de la Universidad Nacional Autónoma de México, pCMV 3-tag-8 NSP6 RRV donado por el Doctor Holloway Gavan de la Universidad de Melbourne de Australia. Estos tienen como marcador de selección resistencia a zeocina, neomicina o higromicina.

Plásmidos con promotores: PPRE X3-TK-luc (Addgene. ID.1015) y NFkB luc, plásmidos comprados en Addgene, Cambridge, MA 02139, USA.

Plásmidos NSPs expresión en eucariotas: Se cortaron los segmentos de ADN de interés de los plásmidos que se expresan en células procariotas con ayuda de diferentes enzimas de restricción: pGEM 3Z NSP1 (SmaI y Hind III), pET-28a NSP2 (Hind III y BamHI), pET-28a NSP3 (Xho I y BstE II), pET-28a NSP4 (Hind III y BamHI) y pET-28a NSP5 (Hind III y BamHI); estos plásmidos fueron amablemente donados por los doctores Carlos Arias y Susana López del laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizó buffer R de BioLabs® (10mM Tris-HCl pH8.5, 10mM MgCl₂, 100mM KCl₂, 0,1mg/ml BSA), se incubaron a 37°C por una hora (teniendo en cuenta las especificaciones del fabricante en donde cada unidad de enzima digiere 1µg de DNA en una hora a 37°C en 50 µl de buffer). Las enzimas se inactivaron con temperatura entre 65 a 80°C por 20 minutos (dependiendo las especificaciones del fabricante). Las diferentes muestras fueron almacenadas hasta su uso a -20°C. Para realizar la ligación, los fragmentos de DNA fueron ligados al plásmido de expresión en eucariotas pcDNA3.1 Hygro(-) para (NSP2, NSP4 y NSP5), pcDNA4 Myc para (NSP3) y pCR-flag para (NSP1), se incubaron toda la noche a 4°C en presencia de buffer ligasa 1X BioLabs® (50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1mM ATP pH7.5) y ligasa DNA T4.

Posteriormente para detectar los plásmidos que efectivamente fueron ligados, estos fueron transfectados a bacterias *E. coli* DH5α y seleccionados con el uso de antibióticos como ampicilina y kanamicina. Una vez seleccionadas las bacterias, se extrajeron los plásmidos por medio de la técnica miniprep. Los plásmidos purificados se almacenaron a -20°C hasta su uso

7.3 TRANSFORMACIÓN, MANTENIMIENTO DE BACTERIAS COMPETENTES Y EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS

Una alícuota de 200 µl de bacterias XL1BLUE, BL21 o DH5α se mezclaron con aproximadamente 10 ng de ADN plasmídico disuelto en 100 µl de una solución de KCl 100 mM, CaCl₂ 30 mM y MgCl₂ 50 mM y cuantificado a 260 nm en un GeneSpec I. La mezcla de bacterias y ADN se agitaron suavemente y posteriormente se incubaron en hielo durante 20 minutos. Con el objeto de proceder a la transformación, las bacterias fueron expuestas a choque térmico a 42 °C durante 2 minutos para garantizar la entrada del vector a la célula. Las bacterias transformadas se sembraron en caldo LB con ampicilina o kanamicina a una concentración final de 100 µg/ml y se incubaron durante 12 a 14 horas a 37 °C.

Así mismo, como control negativo de transformación se tomaron bacterias XL1BLUE, BL21 o DH5α, a las cuales se les realizaron los mismos procedimientos descritos anteriormente, pero sin plásmido que indujera la transformación bacteriana y se crecieron en caldo LB en presencia de ampicilina o kanamicina[112].

Para almacenar bacterias competentes se realizó el siguiente procedimiento: Se incubaron 1ml de cultivo de bacterias en 100 ml de medio LB hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3 – 0,4 a 600nm, se centrifugaron a 5000rpm por 10 minutos y se resuspendió el pellet en 5ml de medio LB con PEG 3350 al 10%, dimetilsulfoxido (DMSO) al 5%, NaCl 100mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM y glicerol al 10% con pH 6,7-7,0; la mezcla se incubó en hielo por 10 minutos y posteriormente las alícuotas se mantuvieron a -80°C. Para medir la viabilidad de las bacterias se sembraron 20µl de bacterias transformadas en 5ml de caldo LB a 37°C toda la noche en agitación constante[112].

Para el aislamiento de plásmidos, bacterias *E. coli DH5α* en medio LB fueron transformadas con los diferentes plásmidos de forma independiente (teniendo en cuenta las características de cada plásmido especificado por Addgene) Como control de selección de las bacterias transformadas se utilizaron antibióticos como ampicilina o kanamicina. La extracción y purificación de los plásmidos se realizó por medio del método miniprep kit (Column-pure plasmid miniprep kit. Abm. Applied Biological Materials Inc). Una vez obtenidos los plásmidos, fueron cuantificados por Nanodrop con el fin de obtener la concentración y pureza de cada uno. Como control cualitativo y para observar los plásmidos obtenidos, fueron analizados en gel de agarosa y tratados con enzimas de restricción (dependiendo de las especificaciones de cada uno), lo cual permite garantizar que la extracción corresponde a los plásmidos de interés. Los plásmidos aislados fueron mantenidos a -20°C hasta su uso.

7.4 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS PROCARIOTAS

Con el fin de obtener proteínas recombinantes de proteínas celulares y virales. Una alícuota de 10µl de bacterias transformadas con plásmidos de interés, fueron incubadas en 10ml de medio LB toda la noche a 37°C en presencia de antibiótico ampicilina o kanamicina. Pasado este tiempo, se llevaron a 100ml con medio LB y se incubaron por 5 horas a 37°C; se adicionaron 1mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubaron por 4h a 37°C; se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 5ml de buffer de lisis (100ml de PBS, 2mM EDTA y 1% laurilsarcocinato) o en buffer de unión cuando el plásmido tenga colas de histidina (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl y 1% laurilsarcocinato); se adicionaron 0,5g de lisozima por cada litro de cultivo y se incubaron a 4°C por 30 minutos, se sonicaron hasta que al ver al microscopio no se observaran bacterias.

7.5 ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

Con el fin de aislar e identificar las proteínas recombinantes NSPs obtenidas de células procariotas. El lisado de bacterias con proteínas expresadas fue almacenado a -80 °C hasta su uso. A las muestras se les adicionó buffer de Laemmli (0.125mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.02% azul de bromofenol) con y sin 5% β-mercaptoethanol; se analizaron por electroforesis SDS-PAGE al 10% y 12% en condiciones reductoras desnaturalizantes. Se colocó 26,61 mg/ml de la proteína a cada uno de los pozos. Se determinó la cantidad de proteína de cada una de las muestras mediante la técnica de NanoDrop (Thermo Scientific) y mediante tinción de los geles con azul de Coomassie. Las muestras fueron transferidas a una membrana PVDF, en condiciones semisecas. La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5%, se reveló utilizando suero hiperinmune contra NSP4, NSP5 o PPARγ. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP 0.4µg/ml) anti-conejo, anti-ratón o anti-cobayo y se reveló utilizando 20µl de una solución que contiene aminoetilcarbazol 0,64mg/ml (AEC), buffer acetato pH 5 (acetato de sodio 0,030 M-ácido acético 0,012M) y peróxido de hidrógeno al 0,36%, por 45 minutos.

7.6 ELECTROELUCION DE PROTEÍNAS

Con el fin de obtener proteínas recombinantes para realizar los ensayos de ELISA *in-vitro* y analizar la unión entre proteínas celulares y virales recombinantes. Una vez identificadas las bandas de interés por Western blot, se cortó el segmento donde se ubicaba la proteína, se colocó en trozos pequeños en un tubo de vidrio y se realizó el montaje. La electroelución de las proteínas se llevaron a cabo en una cámara de electroelución (modelo 422 de Bio Rad) durante 3h a 10 mA constantes por tubo en buffer de corrido (192 mM de Glicina, 25 mM de Tris y SDS 0.1% pH 8.3). Las proteínas electroeluidas se precipitaron con 1:3 acetona durante toda la noche a -80°C y se

centrifugaron a 10000 rpm por 30 minutos a 10°C. El pellet se lavó con etanol frío al 80% y posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm por 30 minutos a 10°C. Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en PBS y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.7 ANIMALES E INOCULACIÓN CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para obtener sueros hiperinmunes de cobayos y ratones contra proteínas no estructurales de rotavirus (NSPs) y proteína celular PPAR γ . La administración de las proteínas recombinantes y mantenimiento de los ratones y cobayos destetados machos se realizó teniendo en cuenta la Ley 84 de 1989 (Estatuto Nacional de Protección de los Animales)[113, 114]. Los ratones y cobayos fueron mantenidos durante un tiempo máximo de 45 días, el alojamiento de los ratones tuvo dimensiones de 36,5cm de alto, 39cm de ancho y 31cm largo, construido en vidrio acústico evitando el estrés causado por el ruido, los ratones en parejas fueron introducidos en una jaula de metal con una malla de ventilación en la parte superior de 25cm de largo, 12,5cm de alto y 18cm de ancho; el alojamiento de los cobayos tenía dimensiones de 36cm de alto, 39cm de ancho y 52cm largo construido de metal; cada jaula tuvo zona de alimentación aislada y se les administro en un biberón agua de la llave previamente autoclavada a libre demanda y como alimento para los ratones concentrado para roedores (Agrinal^R) y para los cobayos concentrado para conejos (El galpón ^R), la temperatura se mantuvo de 20 a 22°C. El alojamiento fue ubicado en el Laboratorio de Biología Molecular de virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Estos animales fueron inoculados subcutáneamente cada 15 días con 0,0159 g/ml de proteína recombinante resuspendida en PBS; 1ml para cobayos y 0,3ml para ratones.

7.8 CEPAS DE ROTAVIRUS, ANTICUERPOS Y REACTIVOS

El rotavirus RRV (mono Rhesus) fue donado por el Doctor Carlos Arias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizó un MOI de 0.8 en donde se obtuvieron aproximadamente el 50% de las células infectadas [104].

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Suero hiperinmune anti-RRV generados en ratón, conejo y cabra, sueros hiperinmunes anti-NSP1, anti-NSP2, anti-NSP3, anti-NSP4, anti-NSP5, anti-NSP6, anti-PDI, anti-PPAR γ y anti-Hsc70 generados en conejo, cobayo o ratón en el Laboratorio de Biología Molecular de virus de la Universidad Nacional de Colombia.

Anticuerpos comerciales policlonales anti-PPAR- γ (SC6285 200 μ g/ml) generado en cabra; anti-p-NF κ B p50(ser 337) (SC33022 200 μ g/ml), anti-I κ β (SC271782 200 μ g/ml), anti-IKK α/β (H-470) (SC7607 200 μ g/ml), anti-p-IKK α/β (Ser176)(SC21661 200 μ g/ml), anti-PGC1 α (H-300) (SC13067 200 μ g/ml), anti-PGC1 (M-142) (SC67286 200 μ g/ml), anti-RXR (SC553 200 μ g/ml) generado en conejo. Anticuerpo monoclonal anti-PPAR γ

(SC7273 200µg/ml), anti-Myc (sc-789 200µg/ml), anti-His (sc-8036 200µg/ml) y anti-flag (F3165. 2MG. Sigma), generados en ratón; todos de Santa Cruz Biotechnology; anticuerpo policlonal anti-NFκB 200µg/ml generado en conejo, que reconoce p50 no fosforilado (Zymed).

Anticuerpos secundarios como: Cabra anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (SC2313 400µg/ml), conejo anti-cabra IgG conjugado con peroxidasa (SC2020 400µg/ml), burro anti-ratón IgG marcado con FITC (SC2024 400µg/ml), cabra anti-conejo IgG marcado con FITC (SC2359 400µg/ml), cabra anti-conejo IgG marcado con CY5 (SC45101 200µg/ml), todos de Santa Cruz Biotechnology y conejo anti-cabra IgG marcado con Alexa 594 (400µg/ml de Invitrogen).

Reactivos como: 2,4 thiazolinediona 153 µM (Código 2295-31-0 de Alfa Aesar), GW9662 153 µM (sc-202641 Santa cruz Biotechnology) y Curcumina 100 µM (Código 458-37-7 de Alfa Aesar).

7.9 TRANSFECCIÓN LINEA CELULAR MA104

Células MA104 (ATCC® CRL-2378.1); población clonal proveniente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), crecidas en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y suero fetal bovino (SFB) al 10%, hasta una confluencia del 80%. Fueron transfectadas con hexagon 6µg/ml y diferentes concentraciones de plásmidos 1, 1.5, 2, 5 µg/ml por un tiempo de incubación de 24, 36 y 48 horas a 37°C en presencia de CO₂.

7.10 ENSAYO MTT

Para medir la viabilidad de las células después de ser transfectadas con diferentes concentraciones de plasmidos. Células MA104 (ATCC® CRL-2378.1) crecidas en medio MEM y SFB al 10%, se les adicionó 20µl de solución MTT por pozo, fueron incubadas por 3.5 horas a 37°C; posteriormente, fue retirada la solución y se adicionó 150µl de solvente de MTT (4mM HCL, 0.1% NP-40, Isopropanol), se incubo a temperatura ambiente por 15 minutos en oscuridad y agitación constante. Las placas fueron leídas a 590nm en un lector Stat Fax 303/Plus.

7.11 EPI-FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Para evidenciar si las proteínas celulares y virales evaluadas se superponen o colocalizan. Células transfectadas fueron fijadas con paraformaldehido al 4% por 30 minutos a 37°C, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% por 5 minutos y para eliminar la autofluorescencia se trataron con 50mM de NH₄Cl y glicina al 0,1M por 30

minutos. Se adicionaron anticuerpos primarios: Sueros hiperinmunes anti-NSPs generados en ratón o cobayo 1:500 y anticuerpo policlonal que reconoce proteínas celulares PPAR γ , PGC1 α , IKK-p, IKK, I κ B, NF κ B-p y NF κ B incubados toda la noche en cámara húmeda; posteriormente se adicionaron anticuerpos secundarios FITC anti-conejo, cabra o cobayo, Rojo Texas anti-cobayo o ratón y DAPI 1:3000 por 45 minutos en cámara húmeda. Las fotografías fueron tomadas en microscopio de epi-fluorescencia SOPTOP (sunny optical technology) o para microscopia confocal en el microscopio Olympus FV1000 de la Universidad de los Andes y analizadas en el programa Image J y Fiji.

7.12 ELISA DE CAPTURA Y DIRECTO

Para evaluar la expresión de las proteínas relacionadas con la vía PPAR γ -NF κ B y estudiar la unión entre estas proteínas tanto *in-vitro* como *in-vivo en células*. En placas de 96 pozos se utilizaron como anticuerpo de captura sueros hiperinmunes que reconoce proteínas no estructurales de rotavirus (1:500) en 50 μ l de PBS, se incubaron a 37°C por dos horas. Posteriormente se bloqueó con leche descremada al 5% durante una hora a 37°C, se lavaron con 200 μ l de PBS y se adicionaron 50 μ l de cada una de las proteínas recombinantes NSPs o lisado celular (células MA104 transfectadas o no fueron lisadas con buffer RIPA -150mM NaCl, 1.0%NP-40, 0.5% DOC, 0.1%SDS, 50mM Tris, pH8.0) se incubaron a 4°C toda la noche; se lavó tres veces con 200 μ l de PBS y se adiciono anticuerpo policlonal que reconoce proteínas celulares PPAR γ , PGC1 α , IKK-p, IKK, I κ B, NF κ B-p y NF κ B (0,2 μ g/ml en PBS), se incubaron a 37°C por una hora, se lavaron tres veces con PBS y se adiciono anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP 0.066 μ g/ml en PBS) que no reconozca el anticuerpo de captura. Finalmente, se reveló utilizando como sustrato O-fenilenediamina diclorhidrato (OPD) diluido en buffer estable de peroxidasa.

Para el ELISA directo se agregó el lisado celular a la placa de 96 pozos y se incubo toda la noche a 4°C, se lavó dos veces con PBS y se bloqueó con leche descremada al 5% durante una hora a 37°C, se lavaron con 200 μ l de PBS, y se adiciono anticuerpo policlonal que reconoce proteínas celulares PPAR γ , PGC1 α , IKK-p, IKK, I κ B, NF κ B-p y NF κ B (0,2 μ g/ml en PBS), se incubaron a 37°C por una hora, se lavaron tres veces con PBS y se adiciono anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP 0.066 μ g/ml en PBS) que no reconozca el anticuerpo de captura. Finalmente, se reveló utilizando como sustrato O-fenilenediamina diclorhidrato (OPD) diluido en buffer estable de peroxidasa. Las placas de ELISA fueron leídas a 490nm en un lector de ELISA Stat Fax 303/Plus.

7.13 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para evaluar la expresión de las proteínas virales NSPs y la proteína celular PPAR γ en células infectadas o no con rotavirus y células transfectadas con plásmidos que expresan NSPs. Células MA104 fueron fijadas con metanol-ácido acético (3:1 v:v) 1 h a 4 °C, fueron lavadas tres veces con PBS, dejando 5 min entre cada lavado, se incubaron 30 minutos con 50 mM de NH₄Cl y se adicionaron anticuerpos primarios que reconocen proteínas celulares PPAR γ y NF κ B-p (1.33 μ g/ml), junto con sueros hiperinmunes contra proteínas no estructurales de rotavirus 1:500, se incubaron durante 1 hora a 37 °C, se lavaron tres veces con PBS y se adicionaron anticuerpos secundarios FITC (0.88 μ g/ml en PBS) y Cy5 (0.88 μ g/ml en PBS), se incubaron por 30 minutos y se dejaron con 200 μ l de PBS. Se detectó la fluorescencia en citómetro de flujo BD FACSCanto II.

7.14 ENSAYO DE LUCIFERASA

Para determinar la actividad transcripcional del promotor de NF κ B y el elemento de respuesta PPAR (PPRE). Células MA104 co-transfectadas con plasmidos que expresan NSPs y plásmidos PPRE X3-TK-luc o NF κ B luc, fueron lisadas con buffer de lisis (Tris 50mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM, 1% de Triton X-100, 50% glicerol y 1X inhibidor de proteasas), se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se siguieron las indicaciones del kit Gaussia Luciferase de BioLabs_{Inc.} La lectura se realizó en el equipo fluorómetro BioTek FLX800TB.

7.15 ESTADISTICA

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado o triplicado con doble repetición cada uno. Los datos fueron expresados con desviación estándar. El análisis de datos se realizó por medio del análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba de Dunnett,(Comparación entre grupos vrs. Grupo control), nivel de significancia alfa de $p < 0.05$ definido como significativo e intervalo de confianza del 95%.

8. RESULTADOS.

8.1 CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Con el fin de identificar la fase de crecimiento en cada una de las cepas bacterianas, se tomaron una, dos o tres colonias de las bacterias DH5 α y una colonia de BL21DE3, las cuales fueron crecidas en caldo LB en diferentes volúmenes (2, 5 o 6 ml), incubadas a 37°C en agitación constante de 350-400 rpm, la absorbancia fue medida cada dos horas hasta completar 12 horas.

Se concluye que las cepas bacterianas DH5 α y BL21DE3 tienen una fase de crecimiento de 4 a 6 horas alcanzando una densidad óptica de 0,3 a 0,8; como estándar de turbidez se utilizó la escala 2 de McFarland, la cual reporta una absorbancia de 0.4 **Figura 1**.

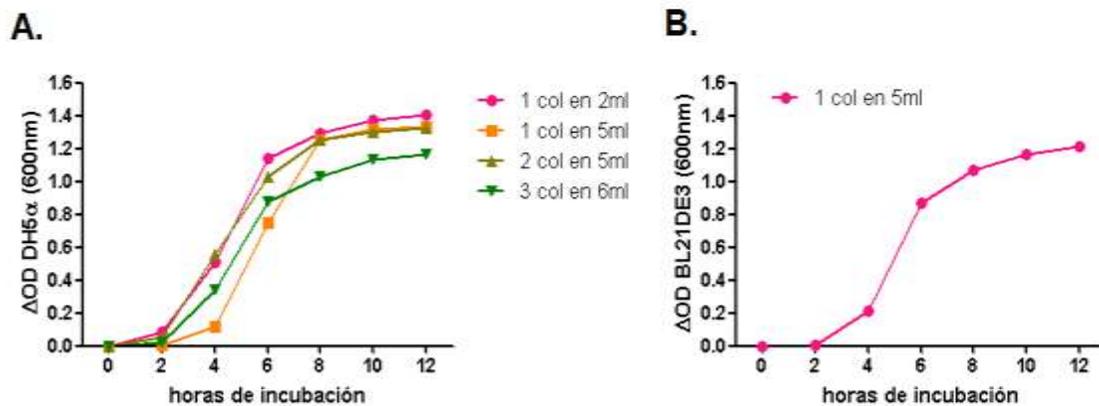


Figura 1. Curvas de crecimiento cepas DH5 α y BL21DE3. **A.** Curva de crecimiento cepa DH5 α en tres volúmenes diferentes de medio LB y con diferente número de colonias. **B.** Curva de crecimiento cepa BL21DE3 en medio LB y con una colonia.

Por otra parte, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano en bacterias DH5 α previamente transformadas con los diferentes plásmidos siguiendo las indicaciones del procedimiento descrito en materiales y métodos.

Cada plásmido tiene diferentes características las cuales van a ser detalladas a continuación:

Plásmido pcDNA4 myc PGC-1 alpha (10974): Plásmido de expresión en eucariotas, tiene un tamaño de 7423pb, el inserto es llamado PGC-I alfa, contiene marcador de selección Zeomicina, contiene dos proteínas de fusión Myc e His en el C-terminal del vector.

Plásmido pCR-Flag-IKKalpha (15467): Plásmido de expresión en eucariotas, tiene un tamaño de 7244pb, el inserto es llamado IKK alfa, contiene marcador de selección Neomicina (G418), contiene una proteína de fusión Flag en el N-terminal del vector.

Plásmido pcDNA flag PGC1 (180-797) (8943): Plásmido de expresión en eucariotas, tiene un tamaño de 7351pb, el inserto es llamado PGC1-alfa (180-797), contiene marcador de selección Neomicina (G418), contiene una proteína de fusión Flag en el N-terminal del vector.

Plásmido pcDNA flag PPAR gamma (8895): Plásmido de expresión en eucariotas, tiene un tamaño de 7047pb, el inserto es llamado PPARg, contiene marcador de selección Neomicina (G418), contiene una proteína de fusión Flag en el C-terminal del vector.

Plásmido p50 cFlag pcDNA3 (20018): Plásmido de expresión en eucariotas, tiene un tamaño de 6684pb, el inserto es llamado NFκB1 (p50), tiene un truncamiento en el sitio de ligación a p105 en los residuos 1-428, contiene marcador de selección Neomicina (G418), contiene una proteína de fusión Flag en el N-terminal del vector.

Plásmido PPRE X3-TK-luc (1015): Plásmido de expresión en eucariotas, tiene un tamaño de 6763pb, el inserto es llamado PPRE-luc, contiene gen reportero luciferasa.

Las indicaciones de uso del Kit de miniprep aconseja sembrar una colonia en 2ml de medio LB para obtener una concentración adecuada del plásmido purificado, con el fin de optimizar el uso de las columnas para dicho fin, se aumenta el volumen de medio utilizado y el número de colonias, evaluando si esta modificación mejora el rendimiento de obtención del plásmido purificado. Al evaluar las curvas de crecimiento realizadas a diferentes volúmenes de medio con una o tres colonias se observa que en los dos casos el crecimiento es similar, concluyendo que se podría aumentar el volumen de medio y el número de colonias sin afectar la viabilidad de las bacterias, por otra parte, al realizar la extracción del plásmido, purificarlo y medir su concentración y pureza con estas modificaciones se concluye que los valores más altos de concentración, con una pureza entre 1.8-2.1 se obtiene con una suspensión de una colonia en 2ml de medio LB. **Figura 2A.**

8.2 PROTEÍNAS RECOMBINANTES NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS (NSPs) Y CELULARES.

Para la obtención de proteínas recombinantes no estructurales de Rotavirus (NSPs) y celulares, se realizaron curvas de crecimiento de los plásmidos que tenían expresión en células procariontas de NSPs de rotavirus, para identificar la hora y absorbancia a la cual la bacteria se encontraba en fase exponencial, esto con el fin de identificar el tiempo ideal al cual se debería agregar el IPTG para expresar la proteína de interés.

Se crecieron bacterias DH5 α y BL21DE3 transfectadas con el plásmido pET-28a, el cual contiene genes que transcriben para proteínas no estructurales de rotavirus NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y gen de resistencia a kanamicina; estas fueron incubadas a 37°C. Se utilizaron diferentes volúmenes 2 y 6 ml de caldo LB y con una o tres colonias; se observó que la fase exponencial de las bacterias ocurrió entre la 4 y 6 hora a una densidad óptica de 0,3-0,4. Indicando el tiempo y densidad de crecimiento a la cual se debió adicionar el IPTG para que se expresara la proteína de interés. Cabe destacar que las bacterias DH5 α fueron seleccionadas para recuperar el plásmido purificado y las bacterias BL21DE3 fueron escogidas para la expresión de la proteína de interés puesto que el vector contiene el promotor T7. **Figura No.2B**

De igual forma, fueron evaluadas bacterias DH5 α transfectadas con los plásmidos 16547, 16549 y 1029 que expresan proteínas celulares y bacterias BL21DE3 transfectadas con el plásmido 25500. Se observó que la fase exponencial de las bacterias ocurrió entre la 4 y 6 hora a una densidad óptica de 0,3-0,4. Indicando el tiempo y densidad de crecimiento a la cual se debe adicionar el IPTG para que se exprese la proteína de interés. **Figura No.2C.**

Acontinuación se presentan las características de los plásmidos que contienen los genes que expresan proteínas celulares:

Plásmido pGST-RXRalpha (16547): Plásmido de expresión en bacterias, tiene un tamaño de 5675pb, el inserto es llamado RXR alfa con una mutación en el dominio de unión a DNA en el sitio N-terminal (aa 1-224), contiene una proteína de fusión GST en el N-terminal del vector.

Plásmido pGST-PPARgamma (16549): Plásmido de expresión en bacterias, tiene un tamaño de 5675pb, el inserto es llamado PPAR gamma con una mutación en el dominio de unión a DNA en el sitio N-terminal (aa 1-248), contiene una proteína de fusión GST en el N-terminal del vector.

Plásmido pGEX-PGC1(1-400) (1029): Plásmido de expresión en bacterias, tiene un tamaño de 6100pb, el inserto es llamado PGC-I alfa tiene solo aa 1-400, contiene una proteína de fusión GST en el N-terminal del vector.

Plásmido RXRG (25500): Plásmido de expresión en bacterias, tiene un tamaño de 8039pb, el inserto es llamado RXRG, contiene una proteína de fusión His en el N-terminal del inserto, el vector contiene promotor T7, se recomienda expresar la proteína en bacterias BL21DE3, tiene gen de resistencia a kanamicina y la temperatura de crecimiento es a 37°C.

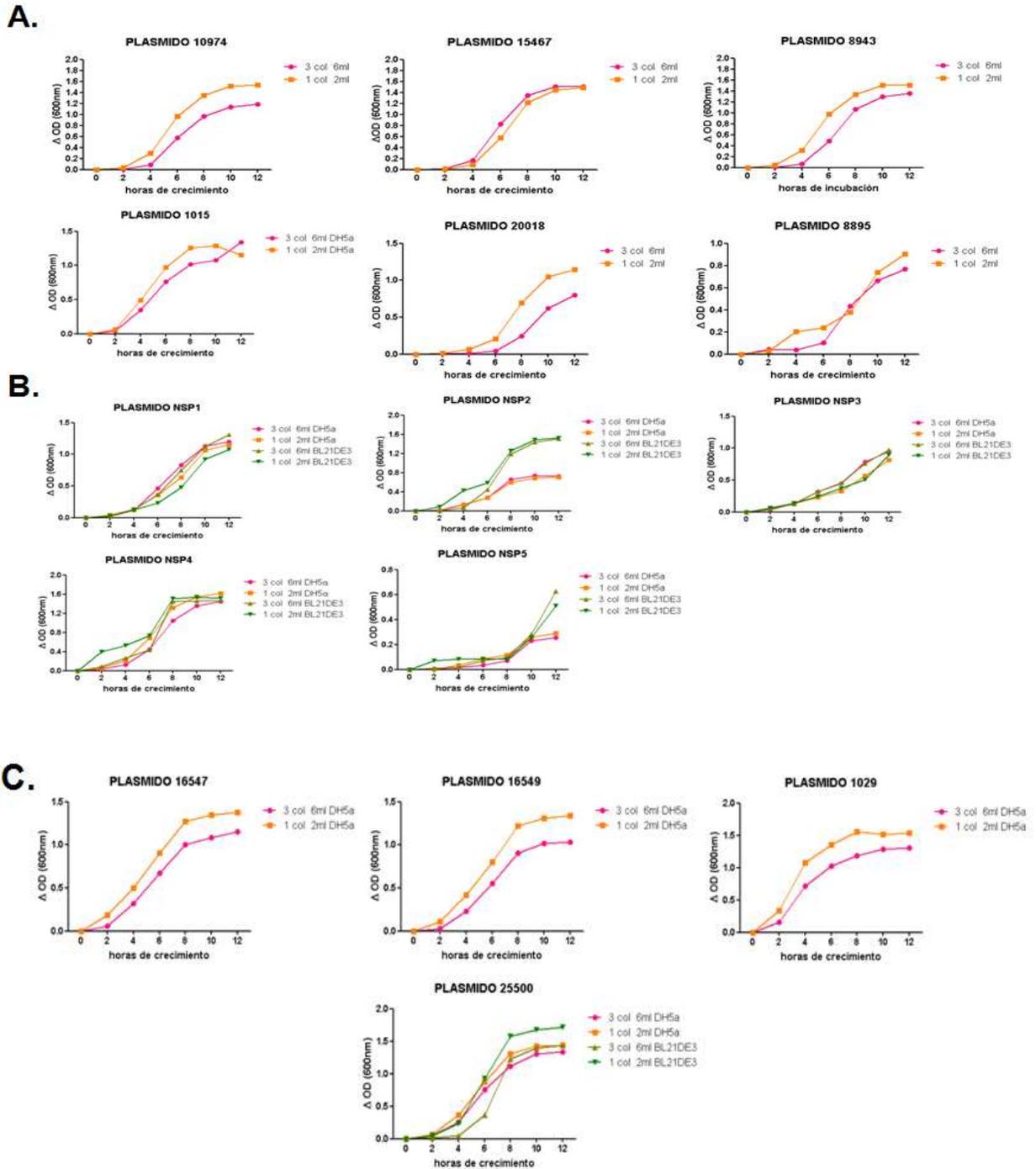


Figura 2. Curvas de crecimiento bacterias transfectadas. **A.** Curvas de crecimiento de 0 a 12 horas de bacterias DH5 α transfectadas con diferentes plásmidos, se siembra una colonia de bacterias en 2ml de caldo LB y tres colonias en 6ml de caldo. **B.** Curvas de crecimiento de 0 a 12 horas de bacterias DH5 α y BL21DE3 transfectadas con diferentes plásmidos que contienen el gen que traducen para proteínas no estructurales de rotavirus NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5, se siembra una colonia de bacterias en 2ml de caldo

LB y tres colonias en 6ml de caldo. **C.** Curvas de crecimiento de 0 a 12 horas de bacterias DH5 α y BL21DE3 transfectadas con diferentes plásmidos que contienen el gen que traducen para proteínas celulares RXR alfa, PPAR gamma, PGC-I alfa y RXRG, se siembra una colonia de bacterias en 2ml de caldo LB y tres colonias en 6ml de caldo.

Una vez se obtuvieron las proteínas recombinantes estas fueron corridas en gel de poliacrilamina al 10 y 12% en condiciones denaturantes, las bandas obtenidas fueron lavadas con buffer PBS, hasta alcanzar un pH de 7.0 (**Figura 3A**), posteriormente, se realizó una emulsión con las bandas aisladas del gel y PBS con la finalidad de realizar diferentes dosis adecuadas para la inoculación de los animales (**Figura 3B y D**), los animales fueron inoculados cada 15 días con 1ml de la proteína correspondiente intradérmica para cobayos y 0,3ml para ratones, pasado este tiempo se obtuvieron los diferentes sueros hiperinmunes de las proteínas NSPs (**Figura 3E y F**); por otra parte, muestras de las emulsiones obtenidas, fueron analizadas por western blot identificando las proteínas no estructurales de rotavirus NSP4 y NSP5 (**Figura 3C**). Las proteínas recombinantes identificadas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

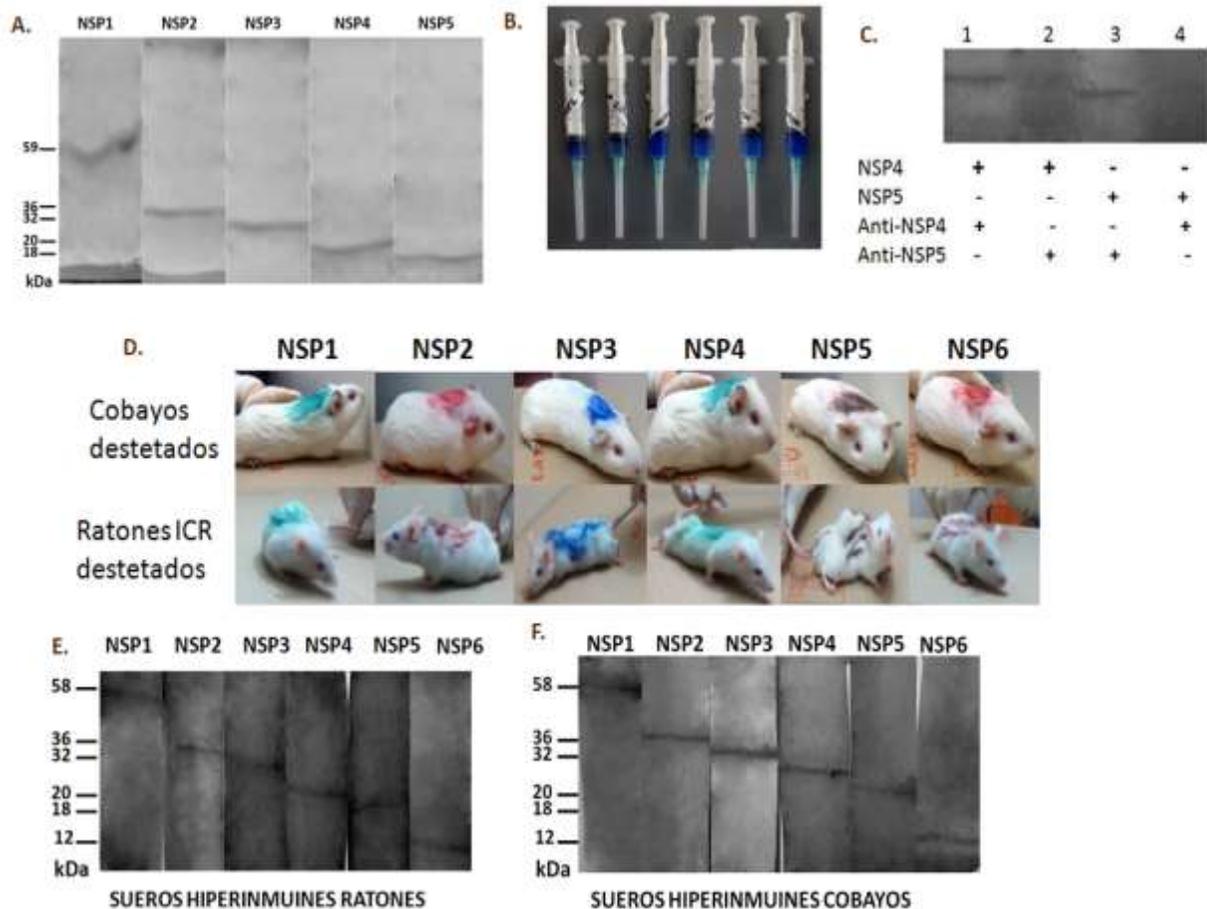


Figura 3. Proteínas recombinantes y sueros hiperinmunes. **A.** Geles de poliacrilamina al 10 y 12% en condiciones denaturantes, las bandas obtenidas corresponden a cada una

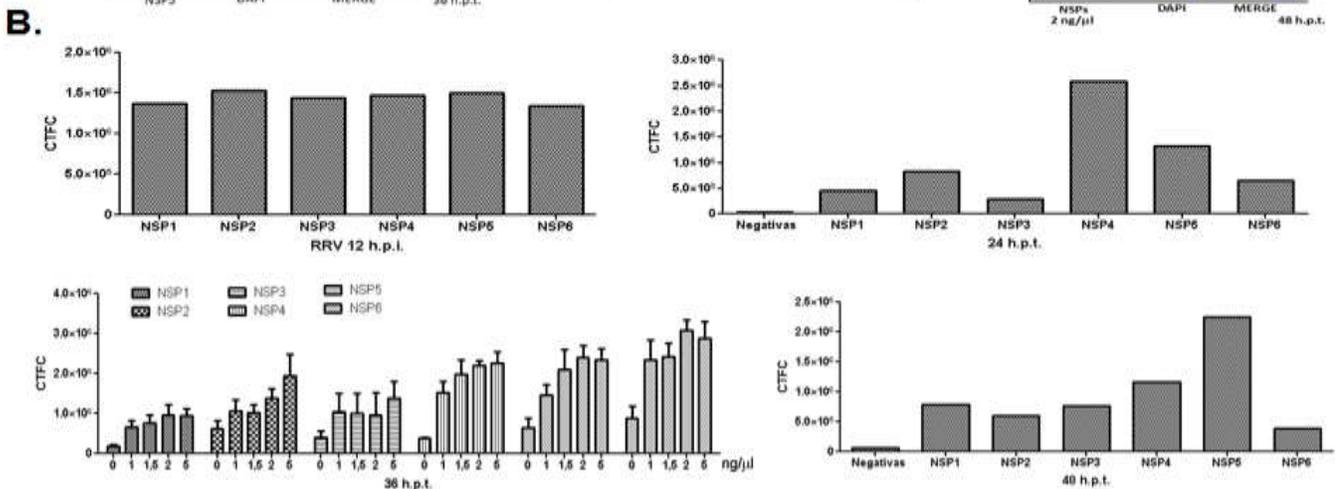
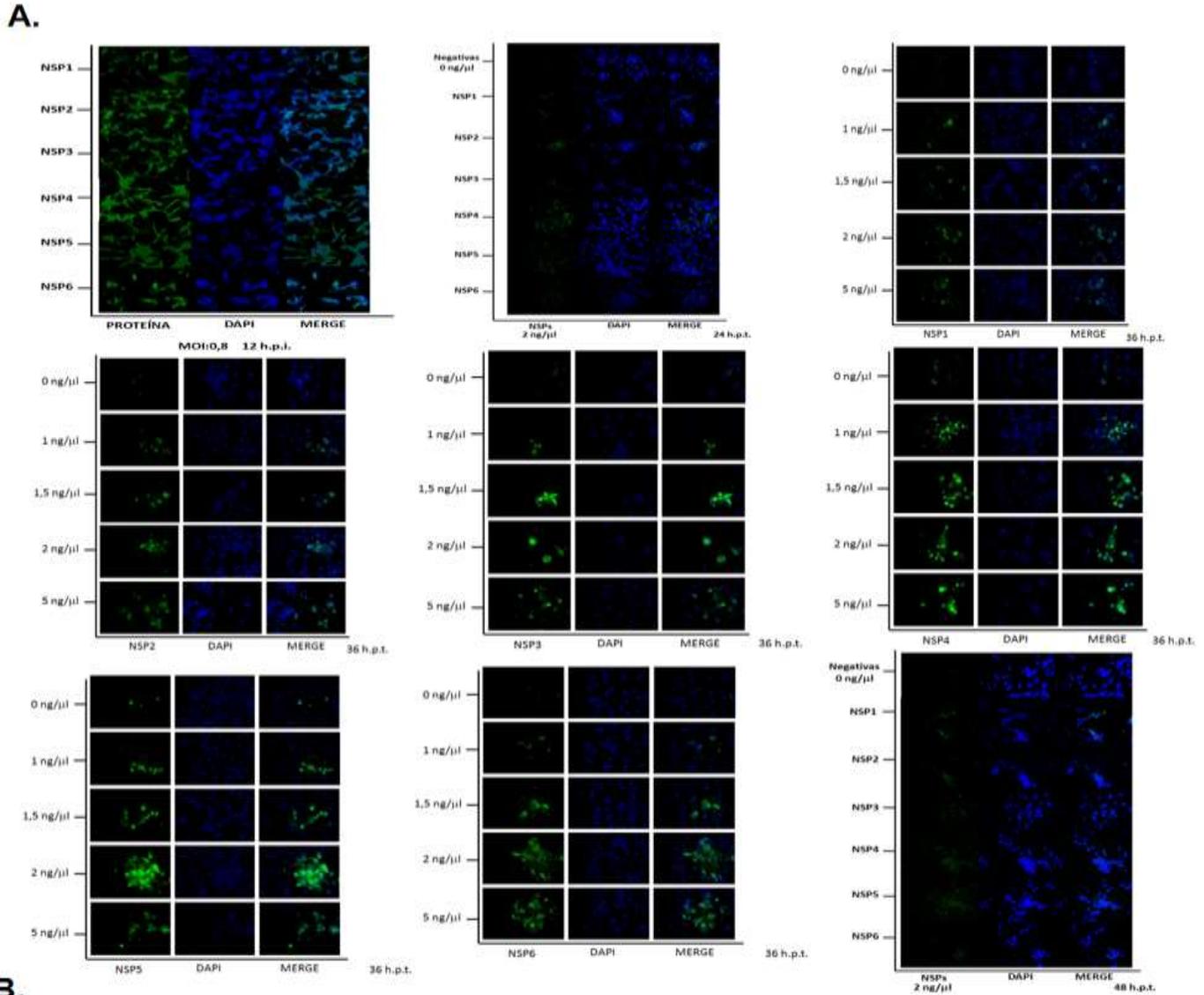
de las NSPs. **B.** Dosis con proteínas no estructurales de rotavirus NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6 y PPAR γ utilizadas para la inoculación de los animales. **C.** Western blot donde se identifica las proteínas NSP4 y NSP5. **D.** Cobayos y Ratones que fueron inoculados con proteínas recombinantes NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6 y PPAR γ . **E – F.** Western blot donde se visualizan las bandas que detectan las diferentes proteínas no estructurales utilizando los sueros hiperinmunes obtenidos de ratones y cobayos.

8.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA TRANSFECCIÓN

Para Identificar la concentración ideal de plásmido y tiempo de incubación a la cual se expresan las proteínas de interés, sin afectar la viabilidad celular y que sea comparable con un ciclo viral (12 horas) en células infectadas con Rotavirus RRV a un MOI:0,8.

Células MA104 al 80% de confluencia fueron transfectadas con plásmidos que expresan NSPs de Rotavirus a diferentes concentraciones (1, 1.5, 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$), fueron incubadas por 24, 36 y 48 horas post-transfección (h.p.t.) a 37°C con 5% de CO₂. La expresión de las proteínas fue detectada mediante la técnica de epi-fluorescencia, se tomaron fotografías y se analizaron por el programa Image J (Analyze, measure). Se observó la expresión de cada una de las NSPs en células infectadas con Rotavirus RRV por 12 h.p.i. y se comparó con la expresión obtenida de las células transfectadas a diferentes concentraciones por 24, 36 y 48 horas. Se encontró que las concentraciones de 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ incubadas a 36 horas son las más cercanas a las observadas en las células infectadas por Rotavirus. **Figura 4A.** En estas mismas muestras se midió la fluorescencia total corregida de cada proteína a las diferentes horas, aplicando la siguiente fórmula: $\text{CTCF} = \text{Densidad integrada} - (\text{área seleccionada de la célula} \times \text{medida de la fluorescencia del área de fondo sin fluorescencia})$, se observó que la fluorescencia obtenida en células infectadas con RRV fue cercana a la calculada en células transfectadas con 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ incubadas por 36 horas. **Figura 4B.** Se determinó la viabilidad celular en las diferentes horas post-transfección mediante la técnica de MTT, se observó que las células que fueron transfectadas por 24 horas, tuvieron una viabilidad celular del 80 al 75% y una baja expresión celular con respecto a las células infectadas por rotavirus. Cuando se analizan las células transfectadas por 36 horas la viabilidad celular fue de 75 al 80% para la concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ y del 70 al 60% para la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$; cuando se analizan los datos de las células transfectadas por 48 horas se observa una viabilidad del 70 al 60% **Figura 4C.** Mediante la técnica de Elisa de captura y Citometría de flujo, se midió la expresión de las NSPs en células infectadas con RRV a diferentes MOI de 0.2, 0.8, 2 y 4 y en células transfectadas con los plásmidos que expresan las NSPs a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ incubadas por 36 horas, donde se observó que la expresión de estas proteínas en células transfectadas con 2 $\mu\text{g/ml}$ por 36 horas, es la más cercana a la obtenida en células infectadas con un MOI de 0.8 para cada una de las NSPs. **Figura 4D y E.**

Estos resultados sugieren que la concentración ideal para transfectar células es de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 36 horas, ya que la viabilidad celular no se ve afectada y la expresión de proteínas de interés es la más cercana a la encontrada en células infectadas con rotavirus RRV a un MOI de 0,8.



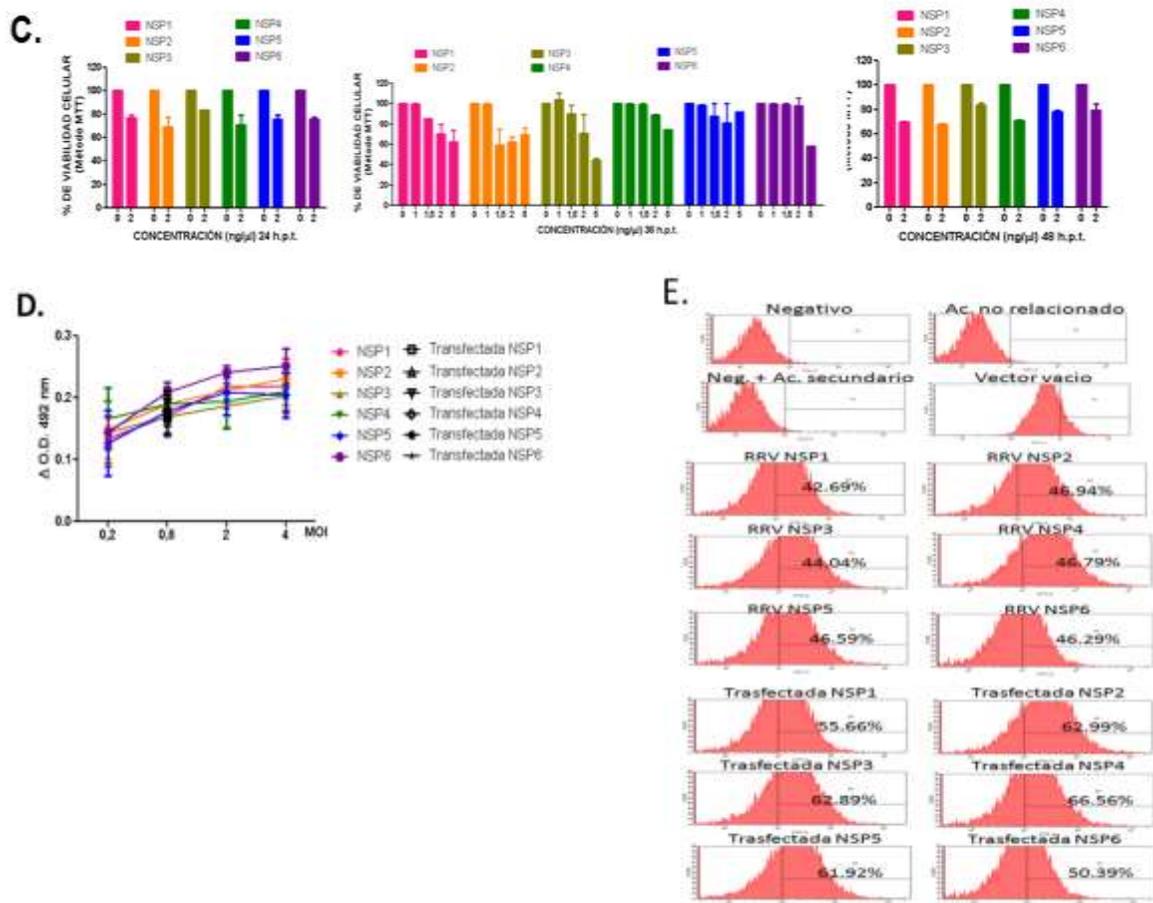


Figura 4. Estandarización de la eficiencia de la transfección. **A.** Epi-fluorescencia. Fotografías representativas de la detección de las NSPs en células MA104 infectadas con rotavirus RRV a un MOI de 0,8 por 12 h.p.i. y células transfectadas con 0, 1, 1.5, 2 y 5 $\mu\text{g/ml}$ por 24, 36 y 48 h.p.t. **B.** Fluorescencia total corregida de cada proteína en células MA104 infectadas y transfectadas. **C.** Viabilidad celular método MTT en células transfectadas con diferentes concentraciones de plásmidos. **D.** Elisa de captura. Expresión de cada NSPs en células infectadas a diferentes MOI y en células transfectadas con $2\mu\text{g/ml}$ de cada plásmido por 36 h.p.t. **E.** Citometría de flujo. Expresión de la proteína NSPs en células MA104 infectadas y transfectadas con $2\mu\text{g/ml}$ de cada plásmido por 36 h.p.t.

8.4 EXPRESIÓN DE PROTEINAS RELACIONADAS CON LA VÍA NF κ B EN CÉLULAS MA104, TRANSFECTADAS CON PLASMIDOS QUE EXPRESAN NSPs DE ROTAVIRUS RRV.

Para determinar la expresión de proteínas celulares como IKK α/β , p-IKK α/β , I κ B, NF κ B, p-NF κ B y el promotor de NF κ B, se realizaron ensayos de ELISA directo y luminiscencia, en

células MA104 transfectadas por 36 h.p.t. con plásmidos que expresan proteínas NSPs de Rotavirus. Para la técnica de ELISA, como control negativo se examinó la expresión de estas proteínas en células MA104 no infectadas, ni transfectadas y en células no infectadas y transfectadas con el vector vacío pcDNA 3.1 Hygro (+); como control positivo se analizaron células infectadas con Rotavirus RRV por 12 h.p.i. a un MOI de 0,8.

Los resultados presentados son el promedio de dos experimentos cada uno por duplicado; en cada pozo se adicionó 74,62 mg/ml de proteína total. Para el análisis estadístico se compararon grupos de células infectadas o transfectadas con el control negativo de células no infectadas, ni transfectadas mediante la prueba de estadística de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba de Dunnett, (Comparación entre grupos vrs. Grupo control), nivel de significancia alfa de $p < 0.05$ e intervalo de confianza del 95%; determinando significancia entre los grupos evaluados.

Al evaluar por Elisa directo, las proteínas IKK α/β e I κ B no se observaron diferencias en su expresión entre las células no infectadas y las células infectadas con Rotavirus o las células transfectadas con cada una de las NSPs (**Figura 5A y C**). Respecto a la proteína fosforilada p-IKK α/β , se observó aumento significativo en su expresión en células infectadas con Rotavirus y células transfectadas con NSP3, NSP4, NSP5 y NPS6 comparadas con el control negativo, mostrando un valor de absorbancia de: Infectadas 0,155 (** $p:0.0004$), NSP3 0,152 (** $p: <0.0001$), NSP4 0,155 (** $p:0.0166$), NSP5 0,149 (** $p:0.0002$) y NSP6 0,137 (* $p:0.0003$) (**Figura 5B**). Para la proteína NF κ B se encontró aumento significativo en su expresión en células infectadas con Rotavirus RRV con una absorbancia de: 0,199 (** $p: 0.0003$) y en células transfectadas con NSP1 0,196 (** $p:<0.0001$), NSP3 0,166 (* $p:<0.0001$) y NSP4 0,167 (* $p:<0.0001$) (**Figura 5D**). Cuando se analizó la proteína NF κ B fosforilada (p-NF κ B), mostró aumento significativo de su expresión en células infectadas con Rotavirus con una absorbancia de 0,208 (** $p:<0.0001$) y en células transfectadas con NSP1 0,168 (** $p:0.0026$), NSP2 0,178 (** $p:0.0002$), NSP3 0,185 (** $p:0.0007$), NSP4 0,168 (** $p:0.0055$), NPS5 0,178 (** $p:0.0003$) y NPS6 0,168 (** $p:0.0033$) (**Figura 5E**).

Por otra parte, por medio de la técnica de luminiscencia se realizó el análisis del promotor de NF κ B, se estudiaron células infectadas con Rotavirus RRV y transfectadas con 2 μ g/ml del plásmido NF κ B-luc, células co-transfectadas con los plásmidos que expresan para cada una de las NSPs a diferentes concentraciones (2, 5 y 8 μ g/ml) y 2 μ g/ml del plásmido NF κ B-luc y como control negativo se utilizaron células transfectadas con 2 μ g/ml del plásmido NF κ B-luc, sin infectar.

Se observó que en las células infectadas con rotavirus la luminiscencia aumentó 225,75 RLU con respecto al control negativo 72,87 RLU, sugiriendo aumento de la expresión del promotor. Al analizar la luminiscencia en cada una de las células co-transfectadas, se observa que aumenta en las células co-transfectadas con NSP4 178,8 RLU y NSP6 178,33 RLU a una concentración de 2 μ g/ml de cada uno de los plásmidos (1:1) (**Figura 5F-K**).

Estos resultados sugieren que RRV activa la vía NFκB, aumentando la expresión de proteínas p-IKK y p-NFκB. Este aumento también se ve reflejado cuando hay expresión de las NSPs 1, 3, 4, 5 y 6. Por otra parte, se evidencia que la infección por rotavirus estimula la activación del promotor de transcripción NFκB, observándose este aumento también en células que expresan proteínas NSP4 y NSP6 a nivel citoplasmático.

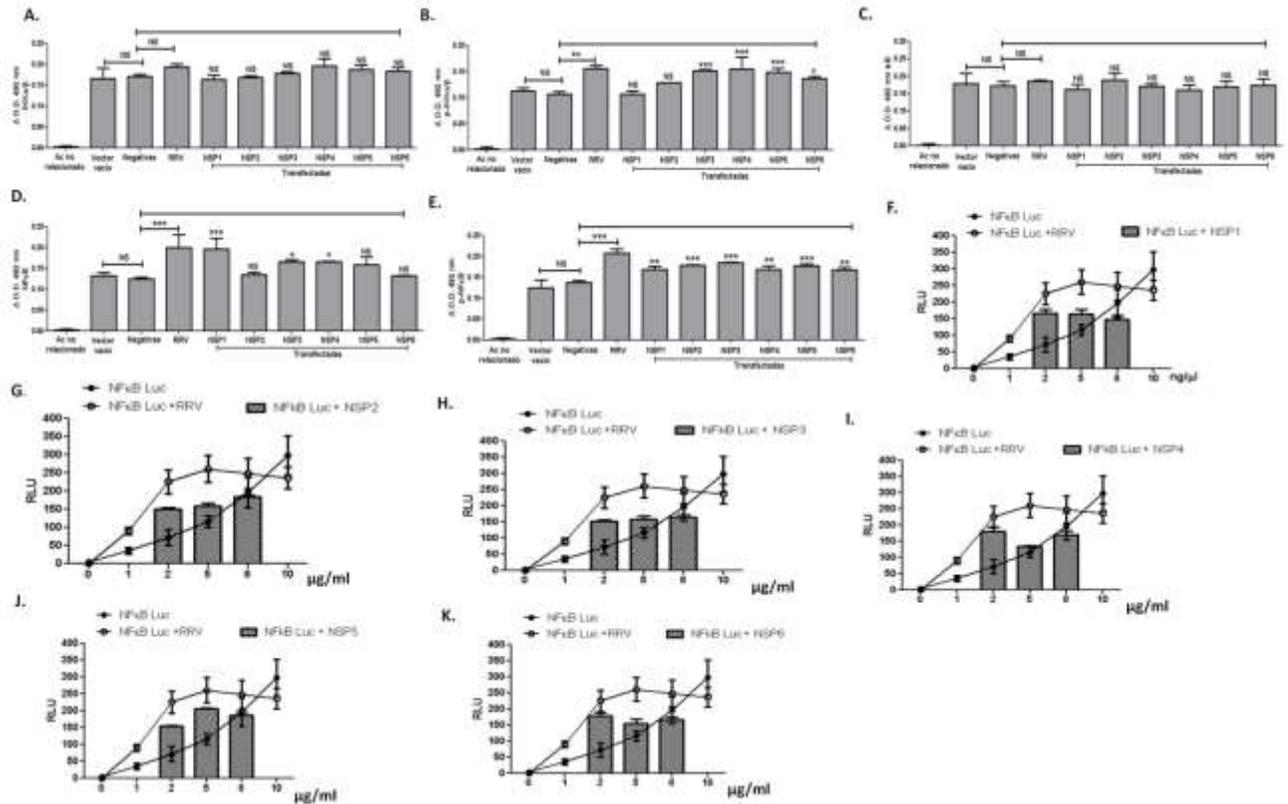


Figura 5. Expresión de proteínas relacionadas con la vía NFκB. **A-E.** ELISA directos de la expresión de las proteínas IKKα/β, p-IKKα/β, IκB, NFκB y p-NFκB en células MA104 transfectadas con plásmidos que expresan NSPs de Rotavirus RRV. **F-K.** Luminiscencia de la actividad transcripcional del promotor de NFκB en células MA104 co-transfectadas con plásmidos que expresan de Rotavirus RRV a diferentes concentraciones 2, 5 y 8 μg/ml y plásmido NFκB-Luc 2 μg/ml.

8.5 EXPRESION DE PROTEINAS RELACIONADAS CON LA VÍA PPARγ EN CÉLULAS MA104, TRANSFECTADAS CON PLASMIDOS QUE EXPRESAN NSPs DE ROTAVIRUS RRV.

Para determinar la expresión de proteínas celulares como PPARγ, PGC1α, RXR y el promotor PPRE, se realizaron ensayos de ELISA de captura, directo, citometría de flujo y luminiscencia, en células MA104 transfectadas por 36 h.p.t. con plásmidos que expresan

proteínas NSPs de Rotavirus. Para la técnica de ELISA, como control negativo se examinó la expresión de estas proteínas en células MA104 no infectadas, ni transfectadas y en células no infectadas y transfectadas con el vector vacío pcDNA 3.1 Hygro (+); como control positivo se analizaron células infectadas con Rotavirus RRV por 12 h.p.i. a un MOI de 0,8.

Los resultados presentados son el promedio de dos experimentos cada uno por duplicado. Para el análisis estadístico se compararon grupos de células infectadas o transfectadas con el control negativo de células no infectadas, ni transfectadas mediante la prueba de estadística de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba de Dunnett, (Comparación entre grupos vrs. Grupo control), nivel de significancia alfa de $p < 0.05$ e intervalo de confianza del 95%; determinando significancia entre los grupos evaluados.

Al analizar por ELISA de captura la proteína PPAR γ , se observó aumento significativo en su expresión en células infectadas con Rotavirus RRV 0,219 (** $p: 0.0071$) y en células transfectadas con NSP1 0,245 (***) $p: < 0.0001$), NSP3 0,210 (* $p: < 0.0001$), NSP5 0,249 (***) $p: 0.0072$) y NPS6 0,227 (** $p: 0.0003$) (**Figura 6A**). Adicionalmente, al estudiar esta misma proteína por citometría de flujo, mostró de igual manera aumento de la expresión en células infectadas con Rotavirus 54.39% y en células transfectadas con NSP1 52.82%, NSP2 52.49%, NSP3 53.96%, NSP5 54.36% y NPS6 51.19% (**Figura 6B**). Respecto a la proteína PGC1 α , se observó aumento significativo en su expresión en células infectadas con Rotavirus 0,179 (* $p: < 0.0001$) y células transfectadas con NSP1 0,221 (***) $p: 0.0005$) y NPS5 0,216 (***) $p: 0.0019$) (**Figura 6C**). Para la proteína RXR se encontró aumento significativo en su expresión en células infectadas con Rotavirus RRV 0,224 (* $p: 0.0211$) y en células transfectadas con NSP4 0,225 (** $p: 0.0167$) y NSP6 0,224 (* $p: 0.0025$) (**Figura 6D**).

Asimismo, por medio de la técnica de luminiscencia se realizó el análisis del promotor PPRE, en células infectadas con Rotavirus RRV y transfectadas con 2 μ g/ml del plásmido PPRE, células co-transfectadas con los plásmidos que expresan para cada una de las NSPs a diferentes concentraciones (2, 5 y 8 μ g/ml) y 2 μ g/ml del plásmido PPRE y como control negativo se utilizaron células transfectadas con 2 μ g/ml del plásmido PPRE, sin infectar.

Los resultados mostraron, que cuando las células son infectadas con rotavirus la expresión de la luminiscencia disminuye a 38,4 RLU con respecto al control negativo 116,025 RLU. Al analizar la luminiscencia en cada una de las células co-transfectadas, no se observa cambios en la expresión con respecto al control negativo. (**Figura 6E-J**).

Estos resultados sugieren que RRV activa la vía inflamatoria a través de NSP4 y NSP6, e inhibe la vía antiinflamatoria disminuyendo la actividad transcripcional de PPRE.

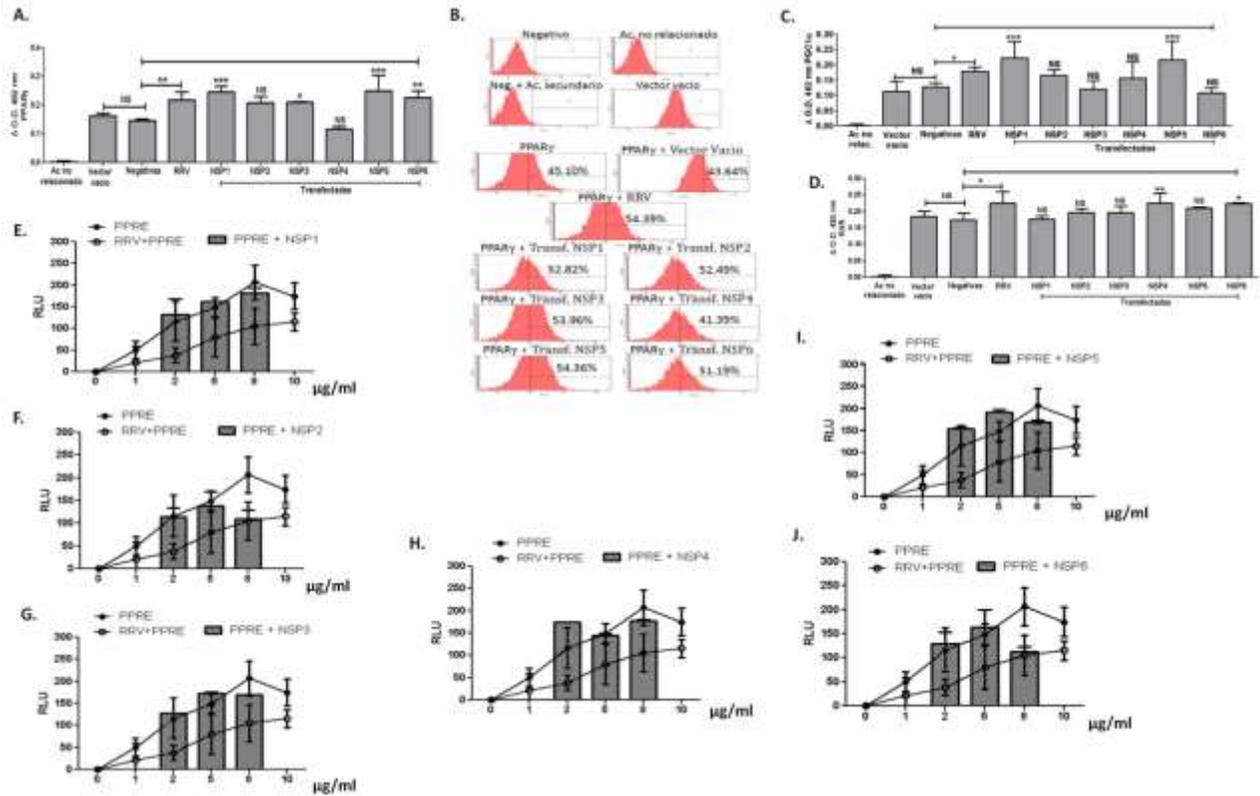


Figura 6. Expresión de proteínas relacionadas con la vía PPAR γ . **A.** ELISA de captura de la expresión de la proteína PPAR γ en células MA104 transfectadas con plásmidos que expresan NSPs de Rotavirus RRV. **B.** Citometría de flujo. Expresión de la proteína PPAR γ . **C-D.** ELISA directo expresión de las proteínas PGC1 α y RXR. **E-J.** Luminiscencia de la actividad transcripcional del elemento de respuesta PPAR (PPRE) en células MA104 co-transfectadas con plásmidos que expresan NSPs de Rotavirus RRV a diferentes concentraciones 2, 5 y 8 $\mu\text{g/ml}$ y plásmido PPRE 2 $\mu\text{g/ml}$.

8.6 DETERMINACIÓN DE POSIBLES COMPLEJOS ENTRE PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 Y NSP6) Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA VÍA PPAR γ – NF κ B.

Con el fin de determinar si hay complejos entre las proteínas no estructurales de rotavirus (NSPs) y proteínas relacionadas con la vía NF κ B (IKK α , p-IKK α/β , NF κ B p50 y p-NF κ B) y la vía PPAR γ (PPAR γ , PGC1 α y RXR), se analizaron proteínas recombinantes (*In-vitro*) y células MA104 (*In-vivo en células*) por medio de ensayos de Elisa de captura, epifluorescencia y microscopia confocal.

Para establecer si hay complejos entre las NSPs y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ *in-vitro*, se obtuvieron proteínas recombinantes celulares rPPAR γ , rPGC1 y rRXR, proteínas virales rNSP1- 5, a partir de bacterias E.coli BL 21(DE3) transformadas con plásmidos pGST-PPARgamma, pGST-RXR α , pGST-RXRbeta, pGEX-PGC1 (1-400),

pET-28a/NSP2, pET-28a/NSP3, pET-28c/NSP4 y pET-28a/NSP5, pGEM 3Z NSP1, pGEM 3Z NSP2, pGEM 3Z NSP3, pGEM 3Z NSP4 y proteína recombinante NSP6 a partir de células Ma104.

Antes de realizar la ELISA de captura de unión *in-vitro*, previamente se combinaron proteínas recombinantes celulares (rPPAR γ , rRXR y rPGC1) con cada una de las rNSPs, a diferentes concentraciones 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 μ g/ml a una proporción de 1:1 por 24 horas, con el fin de garantizar la unión entre estas. Como anticuerpo de captura se utilizaron anticuerpos contra cada una de las NSPs y como anticuerpos primarios se utilizaron anticuerpos contra las proteínas celulares PPAR γ , RXR y PGC1. Como control negativo se detectó la expresión de las proteínas recombinantes de forma individual, tanto para las proteínas recombinantes virales, como las celulares; como control positivo se detectó la unión entre las proteínas virales (rNSP2+rNSP5) y proteínas celulares (rPPAR γ +rRXR y rPPAR γ +rPGC1); uniones que han sido reportadas en la literatura [106].

Para evaluar la unión entre la proteína recombinante rNSP1 y las proteínas recombinantes celulares rPPAR γ , rRXR y rPGC1, se comparó el valor de expresión de las proteínas rNSP1 y cada una de las proteínas recombinantes celulares de forma individual; los valores iguales o mayores a la expresión de proteínas individuales son considerados como positivos para unión. En el análisis del ensayo de ELISA de captura *in-vitro*, mostró unión entre rNSP1, rPPAR γ y rRXR en las diluciones de 1.56, 3.13, 50 y 400 con unos valores de absorbancia unión a rPPAR γ de 0.097 \pm 0.001, 0.414 \pm 0.078, 0.447 \pm 0.038, 0.642 \pm 0.061 y absorbancia de unión a RXR 0.123 \pm 0.080, 0.126 \pm 0.085, 0.211 \pm 0.029 y 0.371 \pm 0.103 respectivamente, comparados con los valores de los controles negativos rNSP1 0.081 \pm 0.004, 0.131 \pm 0.033, 0.227 \pm 0.016 y 0.516 \pm 0.177; rPPAR γ 0.116 \pm 0.005, 0.146 \pm 0.048, 0.300 \pm 0.122 y 0.428 \pm 0.172 y rRXR 0.061 \pm 0.001, 0.197 \pm 0.035, 0.229 \pm 0.030 y 0.403 \pm 0.074 (**Figura 7A-C**).

La unión *in-vivo* en células se realizó por medio de la evaluación de ELISA de captura en células MA104 transfectadas con diferentes plásmidos, se realizaron cuatro modelos de análisis denominados: Co-transfección (**Figura 7D**) (Células MA104 fueron co-transfectadas con 2 μ g/ml por 36 horas con plásmidos que expresan para cada una de las NSPs, pcDNA3.1 Hygro(-) para (NSP2, NSP4 y NSP5), pcDNA4 Myc para (NSP3), pCR-flag para (NSP1) y plásmidos que expresan proteínas celulares pcDNA flag PPAR gamma, p50 cFlag pcDNA3, pcDNA flag PGC1 (180-797), pCR-Flag-IKKalpha, pcDNA4 myc PGC-1 alpha; como control negativo se determinó la expresión de la proteína viral en células transfectadas con los plásmidos que expresan para cada una de las NSPs, como control negativo de la técnica se detectó la expresión de las proteínas en células MA104 sin infectar, ni transfectar y en células transfectadas con el vector vacío se evaluó la expresión de la proteína viral correspondiente, como control positivo de unión se reveló la expresión de proteínas en células co-transfectadas con plásmidos que expresan proteínas virales NSP2+NSP5 y proteínas celulares PPAR γ +RXR, PPAR γ +PGC1 y PPAR γ +NF κ B; para determinar la unión en el ensayo de

ELISA se utilizó como anticuerpo de captura anti-NSPs y como anticuerpo primario anticuerpos contra las etiquetas correspondientes a cada proteína expresada myc o flag); **Infección + transfección (Figura 7E)** (Células MA104 fueron infectadas con rotavirus RRV a un MOI de 0,8 por 12 horas y transfectadas con 2 µg/ml por 36 horas con plásmidos que expresan para proteínas celulares pcDNA flag PPAR gamma, p50 cFlag pcDNA3, pcDNA flag PGC1 (180-797), pCR-Flag-IKKalpha, pcDNA4 myc PGC-1 alpha; como control negativo se determinó la expresión de la proteína viral en células infectadas con Rotavirus, como control negativo de la técnica se detectó la expresión de las proteínas en células MA104 sin infectar, ni transfectar y en células transfectadas con el vector vacío se evaluó la expresión de la proteína viral correspondiente, como control positivo de unión se utilizaron células infectadas detectando la expresión de NSP2+NSP5 o transfectadas e infectadas con plásmidos que expresan proteínas celulares PPARγ+RXR, PPARγ+PGC1 y PPARγ+NFκB; para determinar la unión en el ensayo de ELISA se utilizó como anticuerpo de captura anti-NSPs y como anticuerpo primario anticuerpos contra las etiquetas correspondientes a cada proteína expresada myc o flag); **Transfección (Figura 7F)** (Células MA104 sin infectar fueron transfectadas con plásmidos que expresan para cada una de las NSPs; como control negativo se determinó la expresión de la proteína viral, como control negativo de la técnica se detectó la expresión de las proteínas en células MA104 sin infectar, ni transfectar y en células transfectadas con el vector vacío se evaluó la expresión de la proteína viral correspondiente, como control positivo de unión se utilizaron células transfectadas con plásmidos que expresan cada una de las NSPs detectando la expresión de NSP2+NSP5 y células sin infectar, ni transfectar estudiando proteínas celulares PPARγ+RXR, PPARγ+PGC1 y PPARγ+NFκB; para determinar la unión en el ensayo de ELISA se utilizó como anticuerpo de captura anti-NSPs y como anticuerpo primario anticuerpos contra cada una de las proteínas celulares PPARγ, PGC1, RXR, p-IKK y p-NFκB); **Infección (Figura 7G)** (Células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI de 0.8 por 12 h.p.i. fueron analizadas para determinar la expresión de proteínas celulares y virales NSPs; como control negativo se estudió la expresión de la proteína viral células MA104 sin infectar, ni transfectar y en células transfectadas con el vector vacío correspondiente, como control positivo de unión se utilizaron células infectadas donde se detectó la expresión de NSP2+NSP5 y proteínas celulares PPARγ+RXR, PPARγ+PGC1 y PPARγ+NFκB; para determinar la unión en el ensayo de ELISA se utilizó como anticuerpo de captura anti-NSPs y como anticuerpo primario anticuerpos contra cada una de las proteínas celulares PPARγ, PGC1, RXR, p-IKK y p-NFκB).

Los resultados presentados son el promedio de tres experimentos cada uno por duplicado. Para los experimentos *in-vivo en células*, en el análisis estadístico se compararon grupos de células infectadas o transfectadas con el control negativo de células no infectadas, ni transfectadas mediante la prueba de estadística de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba de Dunnett, (Comparación entre grupos vrs. Grupo control), nivel de significancia alfa de $p < 0.05$ e intervalo de confianza del 95%; determinando significancia entre los grupos evaluados, se comparan los resultados significantes de los cuatro modelos y con base en lo obtenido en el modelo de infección,

se decide si se evidencia unión o no. El análisis de los resultados presentados mostró unión de NSP1 con PPAR γ y con p-IKK α/β .

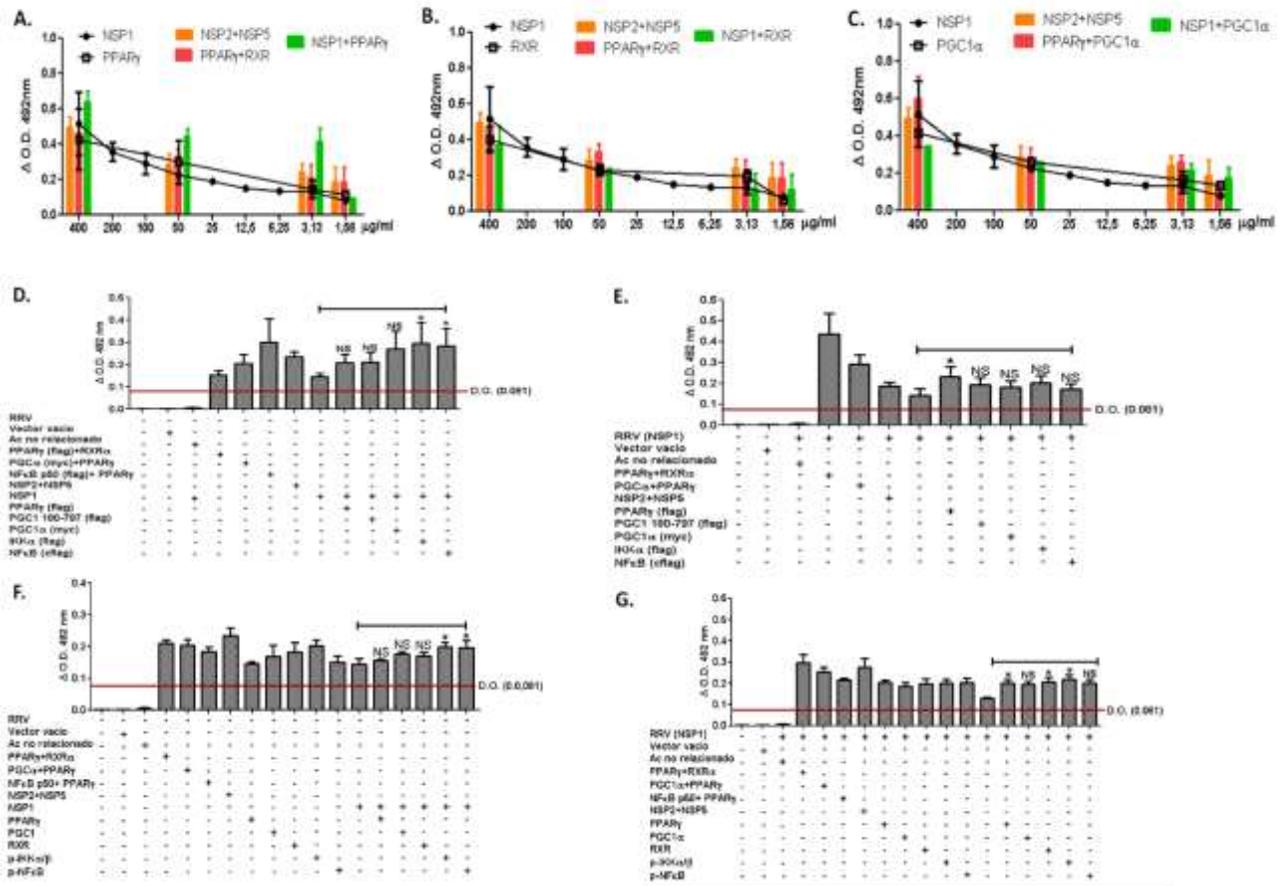


Figura 7. Determinación de la unión entre NSP1 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B *in-vivo en células e in-vitro*. **A-C.** ELISA de captura unión *in-vitro* de las proteínas recombinantes NSP1 con PPAR γ , RXR, PGC1. Expresión de cada proteína a diferentes concentraciones. **D.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 cotransfectadas con plásmidos que expresan proteína viral NSP1 y proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **E.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI:0,8 y transfectedas con plásmidos que expresan proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **F.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 transfectedas con plásmido que expresa proteína viral NSP1. **G.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI:0,8.

El ensayo de ELISA de captura *in-vitro* para la proteína NSP2, mostró unión entre NSP2 y PPAR γ en las diluciones de 1.56, 3.13, 50 y 400 con unos valores de absorbancia de 0.289 ± 0.053 , 0.371 ± 0.033 , 0.484 ± 0.001 y 0.527 ± 0.079 respectivamente, comparados con los valores de los controles negativos NSP2 0.047 ± 0.003 , 0.054 ± 0.001 , 0.201 ± 0.051 , 0.511 ± 0.123 y PPAR γ 0.116 ± 0.005 , 0.146 ± 0.048 , 0.300 ± 0.122 y 0.428 ± 0.172 (**Figura 8A-**

C). Para la ELISA de captura *in-vivo en células*, mostró unión de NSP2 con PPAR γ y con p-IKK α/β (Figura 8D-G).

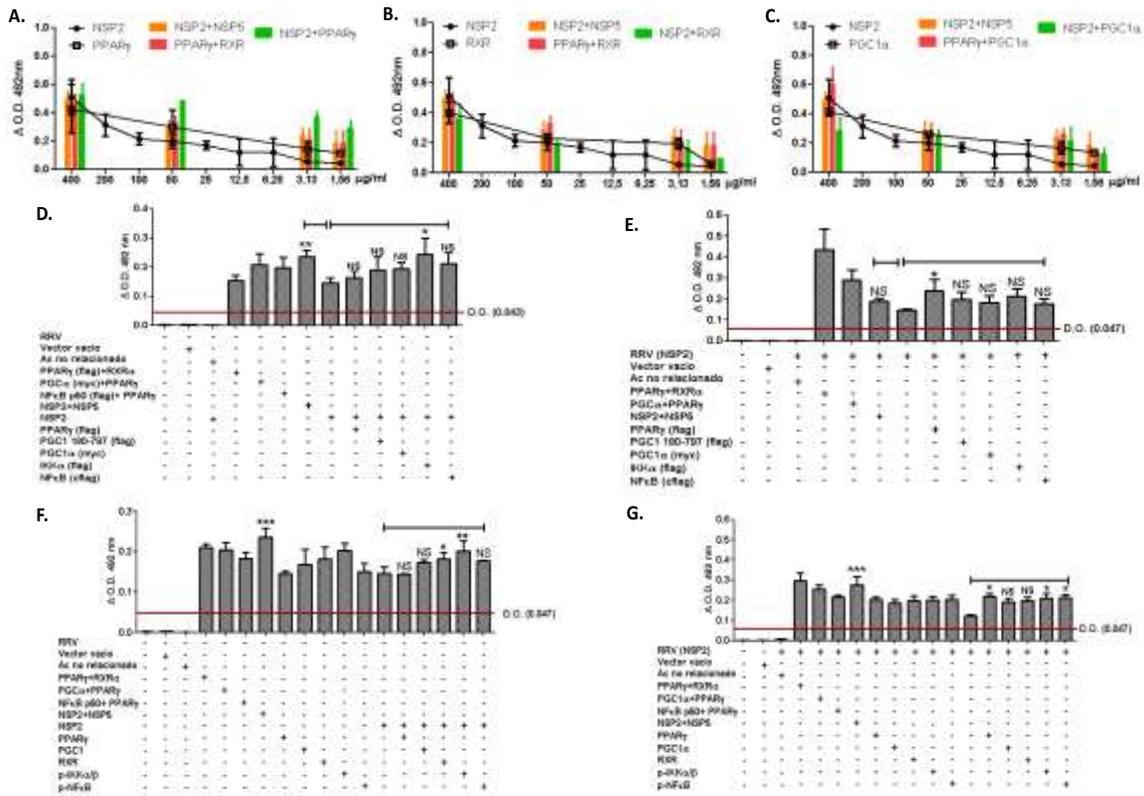


Figura 8. Determinación de la unión entre NSP2 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B *in-vivo en células* e *in-vitro*. **A-C.** ELISA de captura unión *in-vitro* de las proteínas recombinantes NSP2 con PPAR γ , RXR, PGC1. Expresión de cada proteína a diferentes concentraciones. **D.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 cotransfectadas con plásmidos que expresan proteína viral NSP2 y proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **E.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI: 0,8 y transfectedas con plásmidos que expresan proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **F.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 transfectedas con plásmido que expresa proteína viral NSP2. **G.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI: 0,8.

El ensayo de ELISA de captura *in-vitro* para la proteína NSP3, mostró unión entre NSP3 y PPAR γ en las diluciones de 1.56, 3.13, 50 y 400 con unos valores de absorbancia de 0.187 ± 0.083 , 0.243 ± 0.048 , 0.286 ± 0.062 y 0.498 ± 0.052 respectivamente, comparados con los valores de los controles negativos NSP3 0.080 ± 0.050 , 0.099 ± 0.059 , 0.175 ± 0.005 , 0.594 ± 0.114 y PPAR γ 0.116 ± 0.005 , 0.146 ± 0.048 , 0.300 ± 0.122 y 0.428 ± 0.172 (Figura 9A-C). Para la ELISA de captura *in-vivo en células*, mostró unión de NSP3 con PPAR γ y con p-IKK α/β (Figura 9D-G).

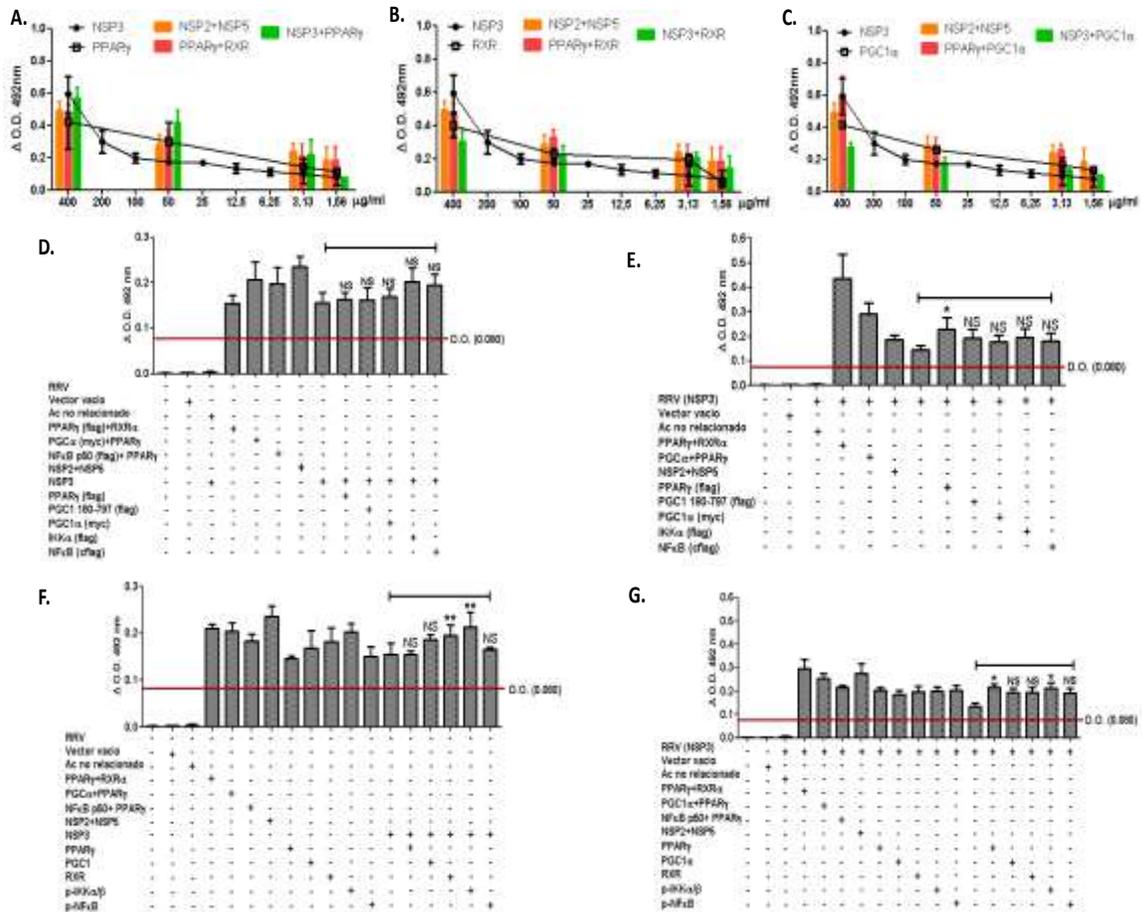


Figura 9. Determinación de la unión entre NSP3 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B *in-vivo en células e in-vitro*. **A-C.** ELISA de captura unión *in-vitro* de las proteínas recombinantes NSP3 con PPAR γ , RXR, PGC1. Expresión de cada proteína a diferentes concentraciones. **D.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 cotransfectadas con plásmidos que expresan proteína viral NSP3 y proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **E.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI:0,8 y transfectadas con plásmidos que expresan proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **F.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 transfectadas con plásmido que expresa proteína viral NSP3. **G.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI:0,8.

El ensayo de ELISA de captura *in-vitro* para la proteína NSP4, mostró unión entre NSP4 y PPAR γ en las diluciones de 1.56, 3.13, 50 y 400 con unos valores de absorbancia de 0.188 ± 0.082 , 0.212 ± 0.072 , 0.333 ± 0.044 y 0.465 ± 0.068 respectivamente, comparados con los valores de los controles negativos NSP4 0.062 ± 0.019 , 0.075 ± 0.037 , 0.227 ± 0.075 , 0.417 ± 0.109 y PPAR γ 0.116 ± 0.005 , 0.146 ± 0.048 , 0.300 ± 0.122 y 0.428 ± 0.172 (**Figura 10A-C**). Para la ELISA de captura *in-vivo en células*, mostró unión de NSP4 con PPAR γ y con p-IKK α/β (**Figura 10D-G**).

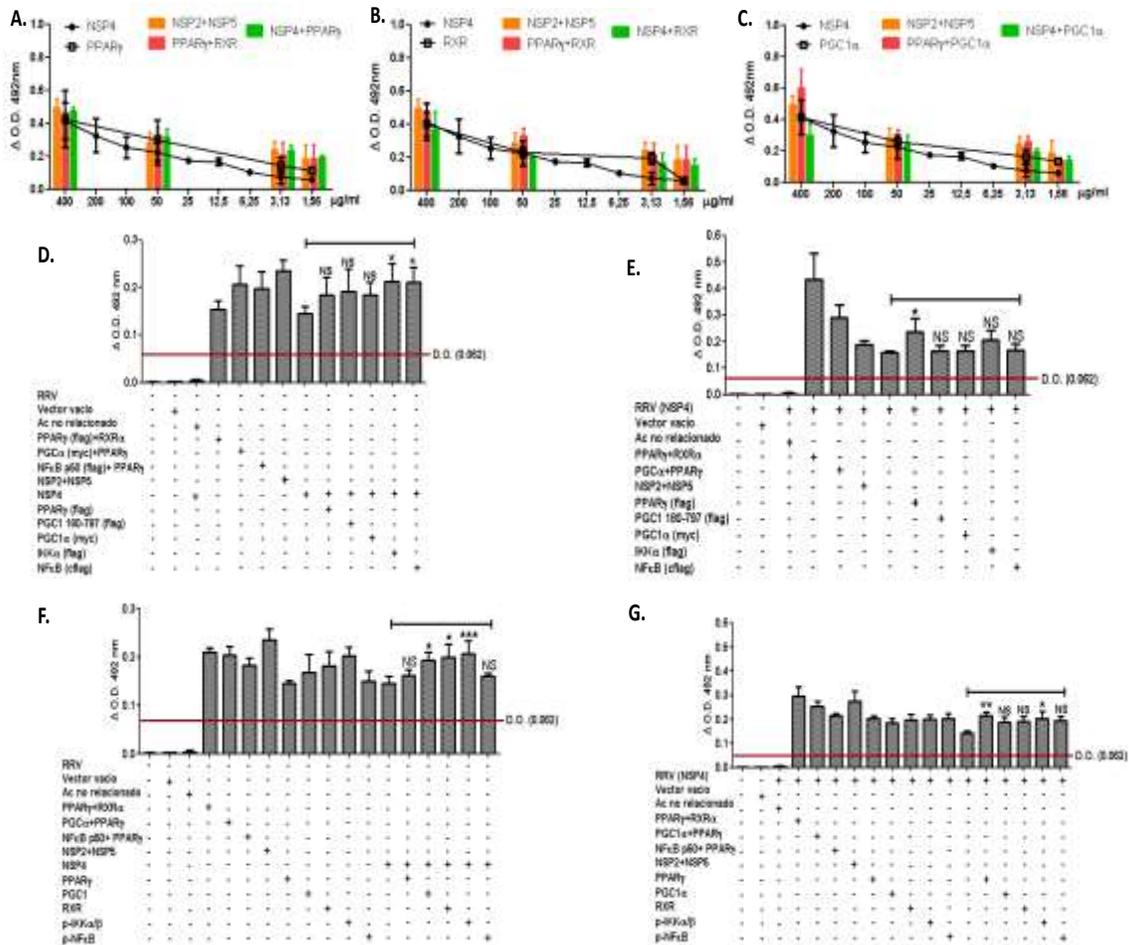


Figura 10. Determinación de la unión entre NSP4 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B *in-vivo* en células e *in-vitro*. **A-C.** ELISA de captura unión *in-vitro* de las proteínas recombinantes NSP4 con PPAR γ , RXR, PGC1. Expresión de cada proteína a diferentes concentraciones. **D.** Elisa de captura unión *in-vivo* en células en células MA104 cotransfectadas con plásmidos que expresan proteína viral NSP4 y proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **E.** Elisa de captura unión *in-vivo* en células en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI:0,8 y transfectedas con plásmidos que expresan proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **F.** Elisa de captura unión *in-vivo* en células en células MA104 transfectedas con plásmido que expresa proteína viral NSP4. **G.** Elisa de captura unión *in-vivo* en células en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI:0,8.

El ensayo de ELISA de captura *in-vitro* para la proteína NSP5, no mostró unión entre NSP5 y las proteínas celulares evaluadas (**Figura 11A-C**). En la ELISA de captura *in vivo*, se observó unión de NSP5 con p-IKK α / β y NF κ B (**Figura 11D-G**).

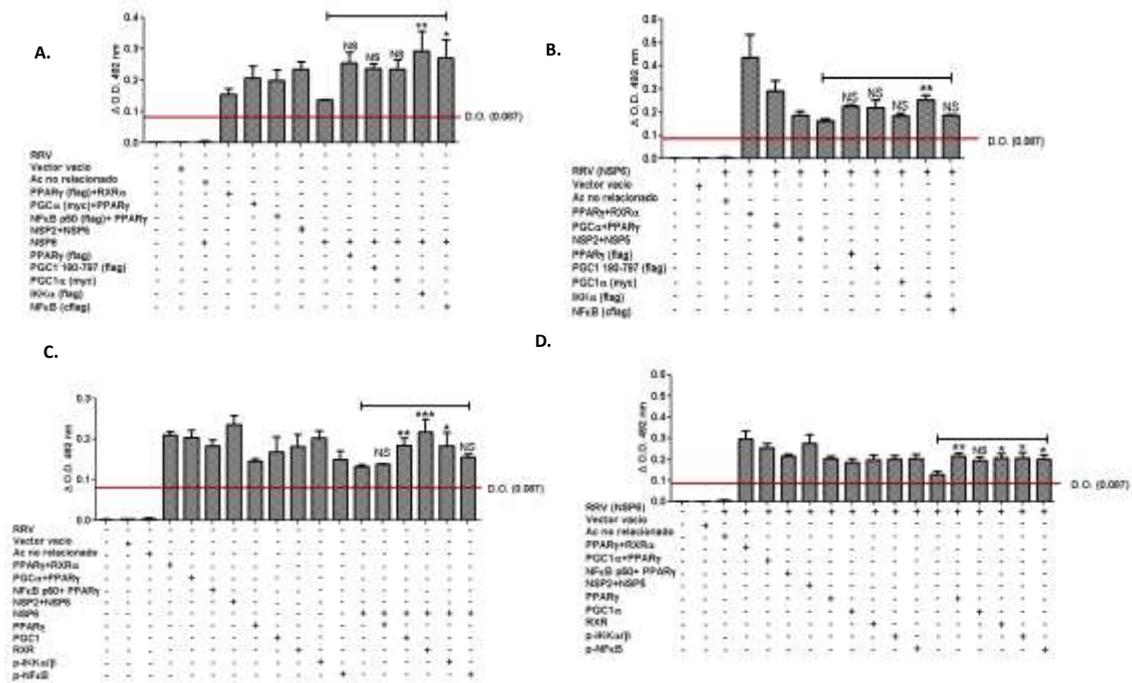


Figura 12. Determinación de la unión entre NSP6 y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B *in-vitro*. **A.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 cotransfectadas con plásmidos que expresan proteína viral NSP6 y proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **B.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI: 0,8 y transfectedas con plásmidos que expresan proteínas celulares etiquetadas con Myc y Flag (PPAR γ , PGC1, IKK α y NF κ B). **C.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 transfectedas con plásmido que expresa proteína viral NSP6. **D.** Elisa de captura unión *in-vivo en células* en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV MOI:0,8.

Estos resultados sugieren que PPAR γ se une con NSP1, 2, 3 y 4, RXR se une con NSP1 y 2, p-IKK se une con 1, 2, 3, 4, 5, 6 y p-NF κ B se une a NSP 5 y 6, tanto *in-vitro* como *in-vivo en células*.

8.7 SUPERPOSICIÓN ENTRE PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 Y NSP6) Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA VÍA PPAR γ – NF κ B

Para precisar si las proteínas no estructurales de Rotavirus (NSPs) que fueron positivas para unión en los ensayos de ELISA de captura *in-vitro* e *in-vivo en células*, están superpuestas con proteínas celulares relacionadas con la vía PPAR γ y NF κ B.

Por medio de la técnica de epi-fluorescencia como una forma de tamizaje para luego evaluar las células por medio de microscopia confocal, se analizó la expresión de cada una de las proteínas en células MA104 transfectadas con cada uno de los plásmidos que expresan NSPs (1-6) y se detectó la expresión de proteínas virales (NSPs) y celulares (RXR, PGC1, PPAR γ , p- KK α / β y NF κ B) por medio de anticuerpos. Posteriormente, en las fotografías tomadas de cada grupo se realizó el análisis del cálculo de superposición de proteínas, utilizando el programa Image J-JaCoP. En esta herramienta se calculó el coeficiente de Pearson, el cual describe la correlación de las distribuciones de intensidad entre los canales, como método de evaluación plantea que valores de -1 corresponde a una exclusión, 0 distribución al azar y +1 colocalización. El coeficiente de superposición (Overlap) es una medida de similitud que calcula la superposición entre dos conjuntos, donde estima que valores de 0 no hay superposición entre los canales y valores de +1 superposición perfecta entre los canales, este coeficiente puede estar dividido en dos sub-coeficientes k1 y k2, los cuales indican el nivel de colocalización de cada canal por separado; finalmente, el Coeficiente de Manders es una variante de los anteriores cálculos, el cual define por separado parte de la intensidad para cada canal y su contribución en el área colocalizada.

Como control negativo se detectó la expresión de las proteínas virales y celulares en células MA104 sin infectar y sin transfectar, como control de transfección se utilizaron células MA104 sin infectar y transfectadas con el vector vacío. Como control positivo se detectó la superposición entre NSP2+NSP5 en células MA104 co-transfectadas con plásmidos que expresan para estas dos proteínas y en células MA104 infectadas con Rotavirus a un MOI de 0.8 por 12 h.p.i.; unión reportada en la literatura [106].

Para evaluar si hay superposición o no entre las proteínas evaluadas, se realizó una comparación entre los valores obtenidos de los coeficientes de los controles positivos y los calculados en las células MA104 transfectadas; considerando como positivo para superposición todos los valores iguales o superiores a los coeficientes de Pearson y Overlap reportados en el control positivo. Los resultados presentados son el promedio de dos experimentos cada uno por duplicado.

Al evaluar la proteína RXR se observa que hay superposición con NSP1, NSP2 y NSP4; obteniendo valores de coeficiente de Pearson de 0.962, 0.960, 0.954; coeficiente overlay 0.969, 0.975 y 0.950 comparados con los calculados en los controles positivos NSP2+NSP5 transfectadas 0.941, 0.939 y RRV 0.944, 0.939 (**Figura 13A**). La proteína PPAR γ mostró superposición con NSP1, NSP2, NSP3 y NSP4; con valores de coeficiente de Pearson de 0.963, 0.960, 0.977, 0.947; coeficiente overlay 0.962, 0.961, 0.985 y 0.968 comparados con los calculados en los controles positivos NSP2+NSP5 transfectadas y RRV (**Figura 13B**). El análisis de la proteína PGC1 reportó que no presenta superposición con ninguna de las proteínas NSPs (**Figura 13C**). La proteína p-IKK α / β evidenció superposición con NSP2, NSP3 y NSP6, con valores de coeficiente de Pearson de 0.982, 0.969, 0.985; coeficiente overlay 0.965, 0.973 y 0.987 comparados con los calculados en los controles positivos NSP2+NSP5 transfectadas y RRV (**Figura 13D**). La proteína p-

NFκB mostró superposición con NSP2 con valores de coeficiente de Pearson de 0.915 y coeficiente overlay 0.946, comparados con los calculados en los controles positivos NSP2+NSP5 transfectadas y RRV (Figura 13E).

Estos resultados sugieren que la proteína PPAR se superpone con NSP 1, 2, 3, 4, RXR se superpone con NSP1, 2, 3, 4, p-IKK se superpone con NSP2, 3, 6 y p-NFκB se superpone con NSP2.

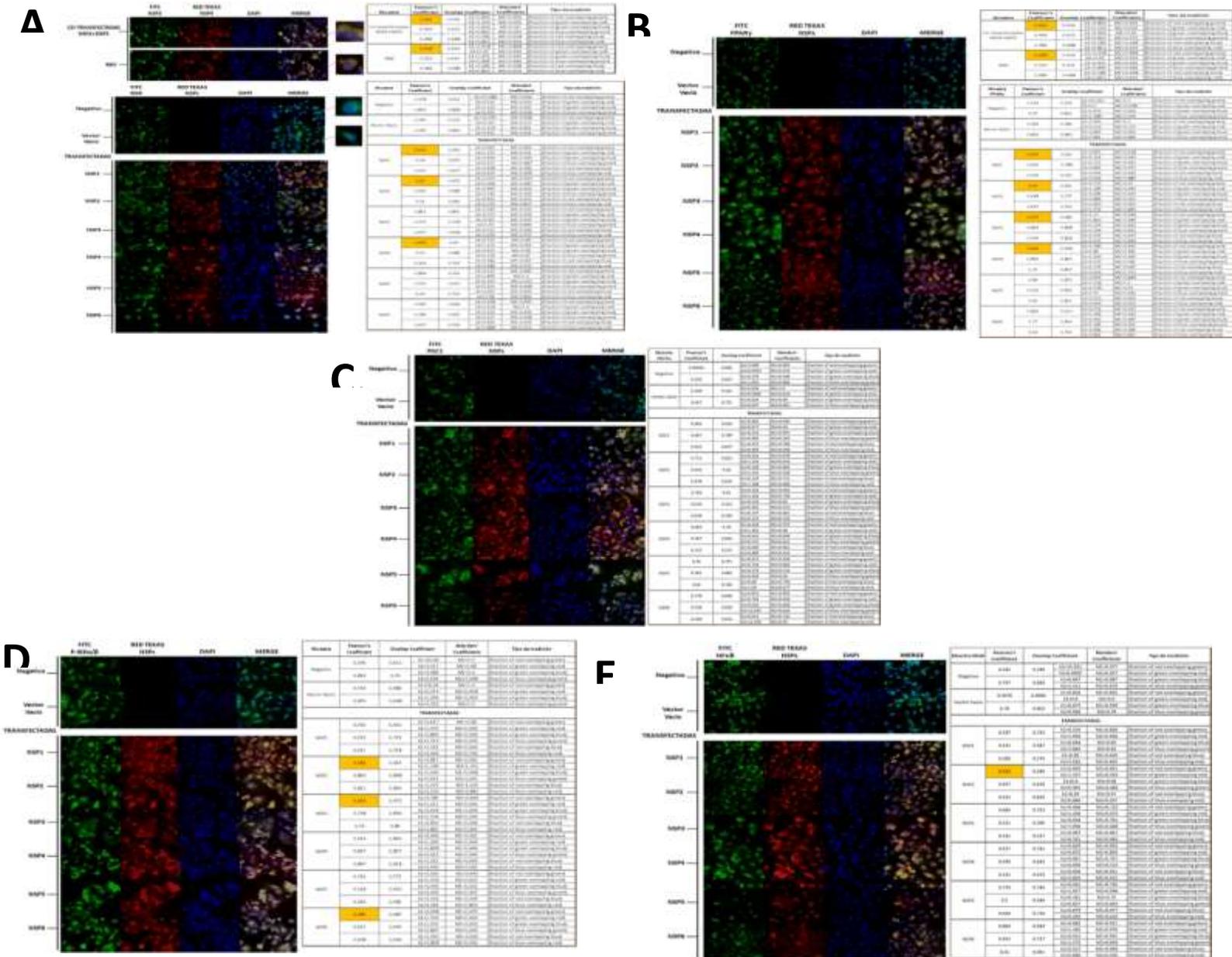


Figura 13. Superposición entre proteínas NSPs y proteínas relacionadas con la vía PPARy – NFκB. **A-E.** Epi-inmunofluorescencia. Fotografías representativas de la

detección de la expresión de las proteínas RXR, PGC1, PPAR γ , p- K α / β y NF κ B, análisis del cálculo de superposición de proteínas celulares y virales, utilizando el programa Image J-JaCoP.

8.8 COLOCALIZACIÓN ENTRE PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 Y NSP6) Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA VÍA PPAR γ – NF κ B

Para determinar si hay colocalización entre proteínas virales y celulares, por medio de la técnica de microscopía confocal y análisis de fotografías por el programa Image J; se analizaron los grupos que en el ensayo de epi-fluorescencia fueron positivos para superposición.

Células MA104 fueron transfectadas con cada uno de los plásmidos que expresan NSPs (1-6) y se detectó la expresión de proteínas virales (NSPs) y celulares (RXR, PPAR γ , p- K α / β y NF κ B) por medio de anticuerpos. Posteriormente, se tomaron fotografías en el microscopio confocal de barrido láser Olympus FV1000, con seccionamiento óptico de las muestras en plano Z (plano de profundidad) con un grosor de 2 μ m, obteniendo 27 fotografías por campo por cada grupo analizado. El análisis del cálculo de colocalización de proteínas se realizó utilizando el programa Image J-JaCoP, calculando los coeficientes de Pearson's, Overlay y Mander's.

Como control negativo se detectó la expresión de las proteínas virales y celulares en células MA104 sin infectar y sin transfectar, como control de transfección se utilizaron células MA104 sin infectar y transfectadas con el vector vacío. Como control positivo se detectó la superposición entre NSP2+NSP5 en células MA104 co-transfectadas con plásmidos que expresan para estas dos proteínas y en células MA104 infectadas con Rotavirus a un MOI de 0.8 por 12 h.p.i.; unión reportada en la literatura [106]. Los resultados presentados son el promedio de dos experimentos cada uno por duplicado.

Al evaluar la proteína RXR se observó que hay colocalización con NSP1; obteniendo valores de coeficiente de Pearson de 0.436 y coeficiente overlay 0.549 comparados con los calculados en los controles positivos NSP2+NSP5 transfectadas 0.430, 0.572 y RRV 0.499, 0.546 (**Figura 14A-B**). La proteína PPAR γ mostró colocalización con NSP1 y NSP3; con valores de coeficiente de Pearson de 0.505, 0.542; coeficiente overlay 0.519 y 0.545 comparados con los calculados en los controles positivos NSP2+NSP5 transfectadas y RRV (**Figura 14A-C**). La proteína p-IKK α / β evidenció colocalización con NSP2, reportando valores de coeficiente de Pearson de 0.548 y coeficiente overlay 0.614, comparados con los calculados en los controles positivos NSP2+NSP5 transfectadas y RRV (**Figura 14A-D**). La proteína p-NF κ B mostró superposición con NSP5 con valores de coeficiente de Pearson de 0.715 y coeficiente overlay 0.725, comparados con los calculados en los controles positivos NSP2+NSP5 transfectadas y RRV (**Figura 14A-E**).

Estos resultados sugieren que PPAR γ colocaliza con NSP1 y NSP3, RXR colocaliza con NSP1, p-IKK colocaliza con NSP2 y p-NF κ B colocaliza con NSP5.

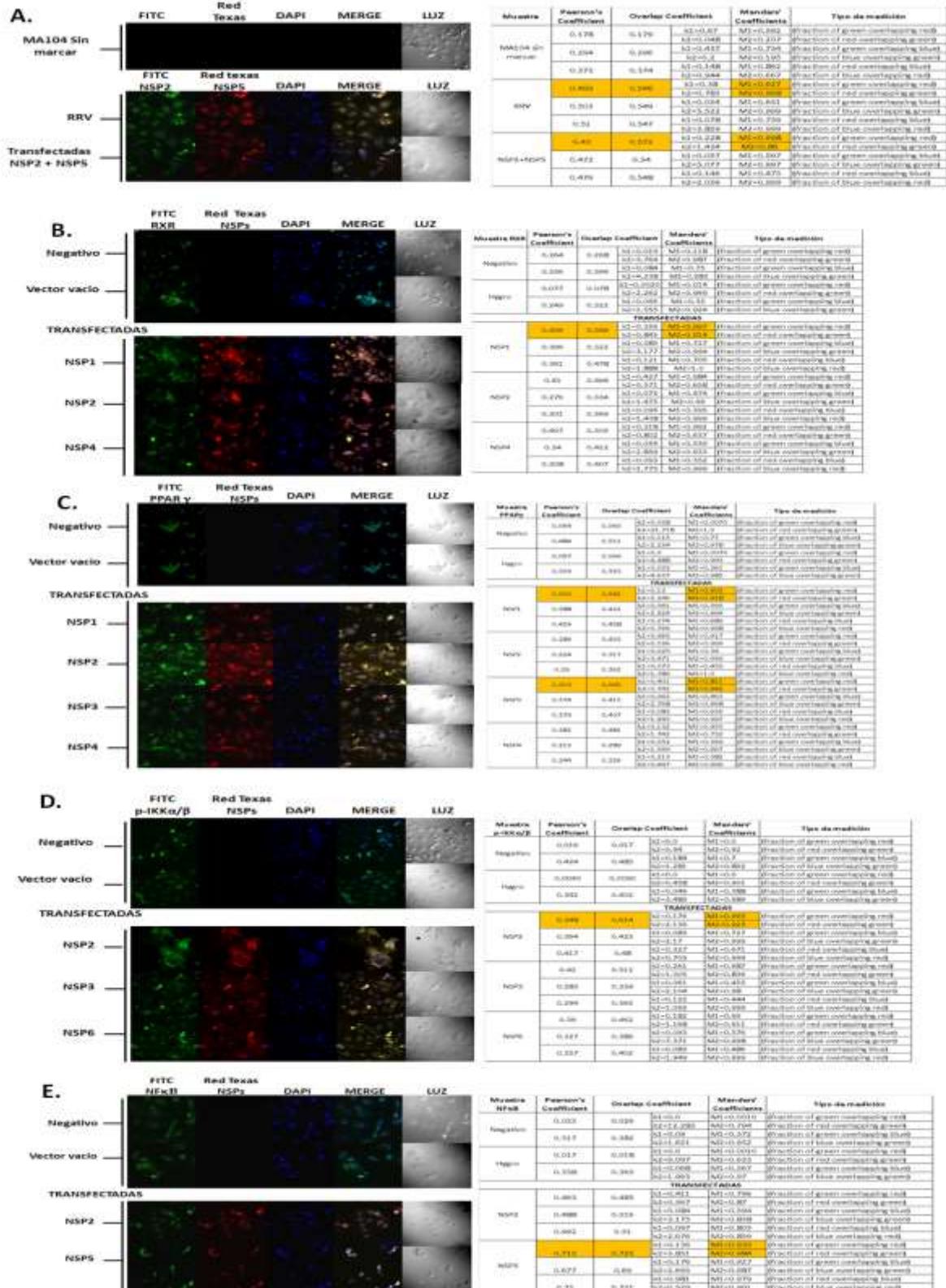


Figura 14. Colocalización entre proteínas NSPs y proteínas relacionadas con la vía PPARγ – NFκB. **A-E.** Microscopia confocal. Fotografías representativas de plano focal Z

con 2µm de grosor, detección de la colocalización de las proteínas RXR, PPARγ, p-KKα/β, p-NFκB y las proteínas virales NSPs. Análisis del cálculo de colocalización de proteínas celulares y virales, utilizando el programa Image J-JaCoP.

8.9 LA INFECCIÓN POR ROTAVIRUS RRV AFECTA LA EXPRESIÓN DE PPARγ A NIVEL CITOPLASMÁTICO Y A NIVEL NUCLEAR

Estudios en modelos de inflamación y cáncer, han documentado que la actividad de PPARγ es inhibida por la vía de señalización TNF-α (Factor de necrosis tumoral alfa); esta inhibición se divide en dos tipos: Primero, la expresión de PPARγ se reduce a nivel de ARNm; segundo, la expresión de PPARγ no cambia y la inhibición es observada mediante la reducción de la actividad transcripcional de PPARγ, dando como resultado la pérdida de la actividad de unión al ADN [115]. Ambos tipos de inhibición son dependientes de la activación de la vía IKK/NFκB [115, 116].

Teniendo en cuenta lo anterior, con el fin de establecer si la expresión de la proteína PPARγ a nivel citoplasmático y a nivel nuclear se ve afectada por la infección por Rotavirus RRV; por medio de la técnica de ELISA de captura se identificó la expresión de las proteínas PPARγ y NFκB en células infectadas con Rotavirus RRV a un MOI de 0.8 por 12 h.p.i. y tratadas con tiazolinediona 153Mm por 12 horas, PPARγ-GW9662 10µM por 12 horas o curcumina 100µM por 12 horas, células sin infectar y transfectadas con plásmidos que expresan cada una de la NSPs, tratadas con tiazolinediona, curcumina o GW9662; para determinar la expresión de PPARγ en el citoplasma y en el núcleo, se realizó extracción de los núcleos en células sin infectar e infectadas con la finalidad de determinar la expresión de la proteína PPARγ de forma diferencial, mediante la técnica de epi-fluorescencia se confirmó visualmente la extracción de los núcleos, donde se identificó la expresión de las proteínas Actina en el citoplasma y PGC1α en el núcleo; adicionalmente, por Western blot se detectó la presencia de PPARγ y p-PPARγ a nivel nuclear y citoplasmático evidenciando la diferencia entre pesos moleculares; además, se evaluó la unión de PPARγ con PGC1α a nivel citoplasmático y nuclear.

Como control negativo se detectó la expresión de las proteínas celulares en células MA104 sin infectar y sin transfectar, como control de transfección se utilizaron células MA104 sin infectar y transfectadas con el vector vacío, como control de expresión celular en células tratadas, MA104 sin infectar son tratadas con tiazolinediona, curcumina o GW9662. Como control positivo, evaluó la expresión de las proteínas celulares en células MA104 infectadas con Rotavirus a un MOI de 0.8 por 12 h.p.i. Los resultados presentados son el promedio de dos experimentos cada uno por duplicado.

Al evaluar la proteína PPARγ, se pudo observar que su expresión aumenta en células infectadas por Rotavirus, con respecto a las células no infectadas (**Figura 15A**), después de realizar el ensayo de extracción de núcleos, se tomaron fotografías representativas de los diferentes grupos, como control se realizó la detección de actina como componente

fundamental del citoesqueleto y PGC1 α como receptor nuclear de PPAR γ , observando que los núcleos fueron efectivamente aislados del citoplasma (**Figura 15B**), por medio de la técnica de Western blot se detectó la expresión de PPAR γ , evidenciándose la presencia de dos bandas tanto en la fracción citoplasmática como en la fracción nuclear, las cuales corresponden a PPAR γ y p-PPAR γ , se puede apreciar que en la fracción citoplasmática la expresión de p-PPAR γ aumenta con respecto a la expresión de PPAR γ en células infectadas, comparadas con células sin infectar; en la fracción nuclear se observa aumento en la expresión de PPAR γ en células infectadas con respecto a las no infectadas, no se observa presencia de banda de la proteína p-PPAR γ (**Figura 15C**), al evaluar la unión entre las proteínas PPAR γ y PGC1 α en las fracciones citoplasmáticas y nuclear, se observó que a nivel citoplasmático no se evidencia unión, a nivel nuclear hay unión en células que han sido infectadas con Rotavirus RRV y en células transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas NSP2 y NSP4 (**Figura 15D-E**). Finalmente, al evaluar si hay cambios en la expresión de PPAR γ en presencia del agonista Tiazolinediona o el inhibidor GW9662, células infectadas con Rotavirus RRV o transfectadas con plásmidos que expresan para cada una de las NSPs, fueron tratadas con cada uno de estos reactivos, se observó que la expresión de PPAR γ disminuye significativamente con respecto a las células infectadas o transfectadas sin tratar (**Figura 15F**); de la misma manera al evaluar la expresión de NF κ B en presencia del inhibidor curcumina, se evidenció que en células infectadas con Rotavirus RRV o transfectadas con plásmidos que expresan para cada una de las NSPs, tratadas con curcumina, la expresión de esta proteína disminuye con respecto a las células que solamente fueron infectadas o transfectadas (**Figura 15G**). Estos resultados sugieren que PPAR γ está siendo fosforilado durante la infección por Rotavirus, encontrándose en el citoplasma; adicionalmente, durante la infección en el núcleo, PPAR γ se encuentra unido a PGC1 α , sin embargo, la actividad transcripcional de PPRE disminuye. Por otra parte, al activar PPAR γ con un agonista como Tiazolinediona, la expresión de esta proteína disminuye en células infectadas, pero la actividad transcripcional aumenta; igualmente, durante la infección aumenta la expresión de NF κ B y su actividad transcripcional, al utilizar un inhibidor de esta proteína se observa que tanto la expresión, como la actividad transcripcional disminuyen.

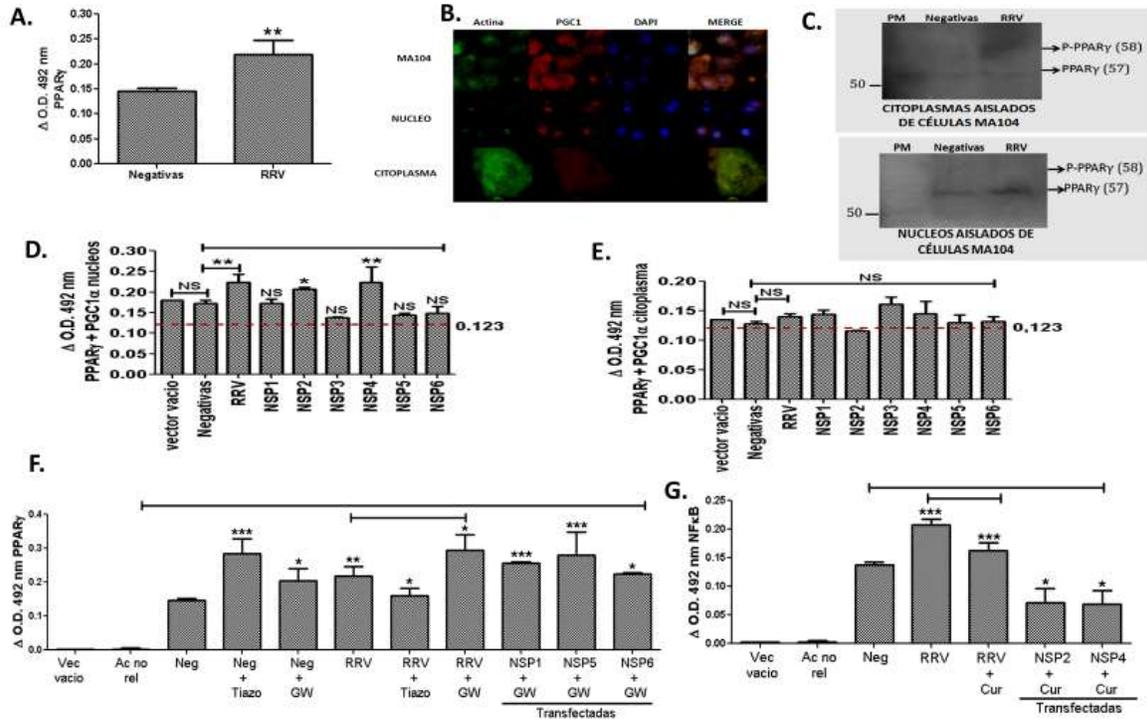


Figura 15. Expresión de PPAR γ a nivel citoplasmático y a nivel nuclear. **A.** ELISA de captura de la expresión de la proteína PPAR γ en células MA104 infectadas con Rotavirus RRV. **B.** Epi-inmunofluorescencia de la expresión de PGC1 y Actina en citoplasma y núcleo. **C.** Western Blot de la expresión de la proteína PPAR γ y p- PPAR γ en núcleo y citoplasma. **D.** ELISA de captura de la unión *in-vivo en células* de las proteínas PPAR γ -PGC1 en células MA104 transfectadas con plásmidos que expresan NSPs de Rotavirus RRV. **E-F.** ELISA directos de la expresión de las proteínas PGC1 y RXR en células MA104 transfectadas con plásmidos que expresan NSPs de Rotavirus RRV.

9. DISCUSIÓN

Estudios anteriores indican que durante la infección con Rotavirus, hay incremento de la expresión de proteínas celulares como NF κ B, Cox-2, HSC70, PDI y PPAR γ ; cuando estas células infectadas son tratadas con un agonista de PPAR γ como pioglitazona, la expresión de estas proteínas disminuye, causando a su vez reducción en la producción de viriones [117]; otros estudios indican que hay fármacos eficientes en combatir la infección por Rotavirus tanto *in vitro*, como en línea celulares [118, 119] *in-vivo en células* en ratones lactantes ICR [118] y en niños [67]. Igualmente, se ha encontrado que los agonistas de PPAR γ , vitamina C, ibuprofeno y diclofenaco, disminuyen la infección por Rotavirus, aunque en menor porcentaje que NAC [67, 119]. También se conoce que los agonistas pioglitazona y rosiglitazona tienen efectos anti-inflamatorios debido a que inhiben la activación de NF κ B [67].

Los resultados de las ELISAS de captura y directa para analizar la expresión de la proteínas celulares relacionadas con la vía PPAR γ -NF κ B, mostraron que la expresión de las proteínas celulares p-IKK α/β , NF κ B y p-NF κ B, PPAR γ , RXR y PGC1 α , aumentaron en células infectadas con Rotavirus y en células transfectadas con las diferentes NSPs. Adicionalmente, por la técnica de luminiscencia, se analizó la expresión del promotor de transcripción de NF κ B observando aumento de su expresión en células infectadas con Rotavirus y en células transfectadas con NSP 4 y 5. Al analizar el factor de transcripción PPRE se observó disminución de la expresión en células infectadas con Rotavirus y en células transfectadas con NSPs. Estos resultados sugieren que RRV activa la vía NF κ B, aumentando la expresión de proteínas p-IKK y p-NF κ B. Este aumento también se ve reflejado cuando hay expresión de las NSPs 1, 3, 4, 5 y 6. Por otra parte, se evidencia que la infección por rotavirus estimula la activación del promotor de transcripción NF κ B, observándose este aumento también en células que expresan proteínas NSP4 y NSP6 a nivel citoplasmático. Por otra parte, la infección por Rotavirus RRV, aumenta la expresión de las proteínas PPAR γ , PGC1 y RXR pero disminuye la actividad transcripcional de PPRE.

La literatura ha reportado que al igual que otros virus, proteínas virales pueden interactuar con proteínas celulares durante el ciclo replicativo viral, Rotavirus establece una interacción íntima y compleja con la célula huésped para contrarrestar las respuestas antivirales provocadas por la célula. De varios receptores de reconocimiento de patrones (PAMP) del huésped, las helicasas de ARN citosólico interactúan con el ARN viral para activar la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), que regula la respuesta de interferón celular. La proteína no estructural de rotavirus 1 (NSP1), que es un conocido antagonista de IFN, interactúa con MAVS y lo degrada, lo que resulta en una pérdida completa de la maquinaria de detección de ARN en la célula infectada [120]. Adicionalmente, se conoce que Rotavirus por medio de la proteína NSP1 inhibe la vía NF κ B por degradación de β -TrcP, la cual es requerida para la degradación de I κ B y activación de NF κ B [121]; también se sabe que la proteína NSP3 participa como sustituto transcripcional del complejo PABP-poli A, interaccionando con el factor de iniciación de la traducción eIF4G, facilitando la traducción de mRNAs virales por medio del reconocimiento del motivo terminal GACC [122]; respecto a NSP4 se sabe que interacciona con caveolina 1, ciclofilina A, ciclofilina 40, Hsp 56 y colesterol, importante para la distribución celular de NSP4 en la célula [123, 124]; así mismo, NSP2 se ensambla en complejo con NSP5, VP1, VP2 y tubulina, para el montaje y maduración del viroplasma [125], y remodelación de la red de microtubulos [126], respecto a NSP6 es conocido que puede afectar funciones mitocondriales durante la infección por Rotavirus [127].

Dado lo anterior, se quiso determinar si hay unión entre proteínas no estructurales de Rotavirus (NSP1, 2, 3, 4, 5 y 6) y proteínas relacionadas con la vía PPAR γ -NF κ B; por medio de las técnicas de ELISA de captura, epi-fluorescencia y microscopia confocal.

Por medio de la técnica de Elisa de captura se evaluaron las uniones *in-vitro* (entre proteínas recombinantes celulares PPAR γ , RXR, PGC1 α y proteínas recombinantes virales NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 y NSP5); dando como resultado unión *in-vitro* entre PPAR γ -NSP1, 2, 3, 4 y RXR-NSP1.

De la misma manera, se evaluó la unión *in-vivo en células* en células MA104; donde se dividieron en cuatro modelos de análisis denominados co-transfección, infección+transfección, transfección e infección; obteniendo como resultado unión *in-vivo en células* entre PPAR γ -NSP1, 2, 3, 4; RXR-NSP1, 6; p-IKK-NSP1, 2, 3, 4, 5, 6 y p-NF κ B-NSP5, 6.

Posteriormente, para precisar si las proteínas no estructurales de Rotavirus (NSPs) que fueron positivas para unión en los ensayos de ELISA de captura *in-vitro* e *in-vivo en células*, están superpuestas con proteínas celulares relacionadas con la vía PPAR γ y NF κ B. Por medio de la técnica de Epi-fluorescencia, se analizó la expresión de cada una de las proteínas evaluadas y se calculó la superposición, mediante los coeficientes de Pearson, superposición (overlap) y manders; concluyendo que PPAR γ se superpone con NSP1, 2, 3, y 4; RXR con NSP1, 2, 3, 4; p-IKK con NSP2, 3, 6 y p-NF κ B con NSP2.

Para determinar si las uniones evidenciadas por superposición están colocalizando, por medio de la técnica de microscopia confocal y el cálculo de los coeficientes de Pearson, superposición (overlap) y manders; se evaluaron las uniones que fueron positivas en la evaluación por Elisa de captura *in-vitro* e *in-vivo en células* y epi-fluorescencia. Donde se observó que PPAR γ colocaliza con NSP1 y NSP3, RXR con NSP1, p-IKK con NSP2 y p-NF κ B con NSP5.

Adicionalmente; estudios anteriores han documentado que la actividad de PPAR γ es inhibida por TNF- α , esta inhibición puede ser dividida en dos tipos: Primero- La expresión de PPAR γ se reduce a nivel de ARN mensajero (ARNm); segundo- la expresión de PPAR γ no cambia y la inhibición es observada mediante la reducción de la actividad transcripcional de PPAR γ , como resultado de la pérdida de la actividad de unión con el ADN [115, 128]. Ambos tipos de inhibición son dependientes de la activación de la vía IKK/NF κ B [128].

Por otra parte, la vía de señalización TNF α , junto con EKK y JNK, fueron reportadas como inhibidores de la actividad transcripcional de PPAR γ , por medio de la fosforilación de los residuos serinas de la proteína [129, 130].

Asimismo, la proteína HDAC3 regulada por TNF- α ; que se encuentra asociada a I κ B a nivel citoplasmático, después de la degradación vía proteosoma de I κ B, se trasloca al núcleo, donde inhibe la actividad transcripcional de PPAR γ , a través de la desacetilación de histonas [131].

Dado lo anterior, con el fin de establecer si la expresión de la proteína PPAR γ a nivel citoplasmático y a nivel nuclear se ve afectada por la infección por rotavirus; por medio de las técnicas de ELISA de captura y Western blot; se observó que la expresión de PPAR γ

aumentaba significativamente cuando las células sin infectar eran tratadas con tiazolinediona y con el inhibidor GW9662, cuando las células son infectadas con Rotavirus RRV aumentan significativamente la expresión de PPAR γ , en células infectadas y tratadas con tiazolinediona disminuye la expresión y en células infectadas o células transfectadas con las diferentes NSPs y tratadas con GW9662 aumenta la expresión de PPAR γ , en presencia de NSP1, NSP5 y NSP6. Adicionalmente; al analizar la expresión de NF κ B, en células infectadas con Rotavirus RRV aumentan significativamente la expresión de NF κ B, en células infectadas o transfectadas con las diferentes NSPs y tratadas con curcumina, la expresión de esta proteína disminuye significativamente, en presencia de NSP2 y NSP4.

Durante la infección por Rotavirus, la expresión de NF κ B y su actividad transcripcional aumentan, se observa que RXR colocaliza con NSP1, PPAR γ colocaliza con NSP1 y NSP3, p-IKK α/β colocaliza con NSP2 y NF κ B colocaliza con NSP5. Adicionalmente, a nivel citoplasmático se detectó que a las 12 h.p.i. PPAR γ está siendo fosforilado. Por otra parte, en el núcleo, PPAR γ se encuentra unido a PGC1 α , sin embargo, la actividad transcripcional disminuye.

10. PERSPECTIVAS

Este trabajo aporta nuevo conocimiento respecto al ciclo replicativo viral de rotavirus, proporcionando nueva información acerca de la formación de nuevos complejos entre las proteínas no estructurales de rotavirus y las proteínas celulares como RXR, PPAR γ y p-IKK α/β a las 12 horas post-infección; adicionalmente, se observa que durante la infección la proteína PPAR γ está teniendo modificaciones post-traduccionales como la fosforilación explicando de esta manera la disminución observada en la actividad transcripcional al evaluar PPRE. Cabe resaltar que es de gran importancia, continuar en el estudio de la relación de vía anti-inflamatoria y la infección por rotavirus; corroborando las uniones de estas proteína por métodos más sensibles como FRET, identificando cuales serían las funciones de estos complejos dentro del ciclo replicativo viral, estudiando los niveles de RNA mensajero de PPAR γ y esclareciendo paso a paso que ocurre con esta vía de señalización cuando la células son infectadas con rotavirus y que sucede cuando la proteína es activada por algún agonista.

11. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. *Nota informativa vacunas contra el rotavirus*. Acerca del rotavirus 2015 [cited 2015].
2. Organization, W.H. *Children: reducing mortality. Fact sheet N°178*. 2014 www.who.int].
3. Romero Cabello Raúl, *Microbiología y parasitología humana*. Vol. 3. 2007, Mexico: Panamericana.
4. Pesavento, J., Crawford SE., Estes MK. and Venkataram Prasad BV, *Rotavirus Proteins: Structure and Assembly*. CTMI, 2006. **309**: p. 189–219.
5. Estes, M.K., and J. Cohen, *Rotavirus gene structure and function*. Microbiol. Rev. , 1989. **53**(4): p. 410.
6. Haselhorst, T., Fleming FE, Dyason JC, Hartnell RD, Yu X, Holloway G, Santegoets K, Kiefel MJ, Blanchard H, Coulson BS, von Itzstein M, *Sialic acid dependence in rotavirus host cell invasion*. Nat Chem Biol, 2009. **5**: p. 91-93.
7. Guerrero, C.A., Méndez Ernesto, Susana López, Carlos F. Arias Pavel Isa, Tomás López, Rafaela Espinosa, Pedro Romero, Daniela Bouyssounade and Selene Zárate., *Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry*. J. Virol., 2002. **76**(8): p. 4096.
8. Zárate, S., Mariela A. Cuadras, Rafaela Espinosa, Pedro Romero, Karla O. Juárez, Minerva Camacho-Nuez, Carlos F. Arias, and Susana López, *Interaction of Rotaviruses with Hsc70 during Cell Entry Is Mediated by VP5*. J. Virol. , 2003. **77**(13): p. 7254.
9. Calderon, M.N., Guerrero C.A., Acosta O., Lopez S., Arias C.F., *Inhibiting rotavirus infection by membrane-impermeant thiol/disulfide exchange blockers and antibodies against protein disulfide isomerase*. Intervirology, 2012.
10. Guerrero Carlos A and Acosta Orlando, *Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection*. World Journal of Virology, 2015. **submission**: p. 1-71.
11. Gómez, D., Muñoz, N., Guerrero, R., Acosta, O., & Guerrero, C. A., *PPAR γ Agonists as an Anti-Inflammatory Treatment Inhibiting Rotavirus Infection of Small Intestinal Villi*. PPAR research, 2016. **2016**(4049373).
12. Barro Mario and Patton John T, *Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3*. PNAS, 2005. **102**(11): p. 4114–4119.
13. Sen, A., Feng N, Ettayebi K, Hardy ME, Greenberg HB, *IRF3 inhibition by rotavirus NSP1 is host cell and virus strain dependent but independent of NSP1 proteasomal degradation*. J Virol, 2009. **83**: p. 10322-10335.
14. Barro M and Patton JT, *Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7*. J Virol 2007. **81**: p. 4473-4481.
15. Feng, N., Sen A, Nguyen H, Vo P, Hoshino Y, Deal EM, Greenberg HB, *Variation in antagonism of the interferon response to rotavirus NSP1 results in differential infectivity in mouse embryonic fibroblasts*. J Virol, 2009. **83**: p. 6987-6994.
16. Graff, J.W., Ettayebi, K., Hardy, M. E, *Rotavirus NSP1 inhibits NF κ B activation by inducing proteasome-dependent degradation of β -TrCP: a novel mechanism of IFN antagonism*. PLoS Pathog 2009. **5**: p. e1000280
17. Firth AE and Brierley I, *Non-canonical translation in RNA viruses*. J Gen Virol, 2012. **93**: p. 1385-1409

18. Piron, M., Vende P, Cohen J, Poncet D, *Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F*. EMBO Journal, 1998. **17**(19): p. 5811-5821.
19. Deo, R., Groft CM, Rajashankar KR, Burley SK, *Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer*. Cell, 2002. **108**: p. 71-81.
20. Rodríguez-Díaz J; Banasaz M, I.C., Buesa J, Lundgren O, Espinoza F, Sundqvist T, Rottenberg M, Svensson L. , *Role of nitric oxide during rotavirus infection*. J Med Virol., 2006. **78**(7): p. 979-85.
21. Bhowmick, R., Halder UC, Chattopadhyay S, et al, *Rotaviral Enterotoxin Nonstructural Protein 4 Targets Mitochondria for Activation of Apoptosis during Infection*. The Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(42): p. 35004-35020.
22. Hu, L., et al., *Rotavirus non-structural proteins: structure and function*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(4): p. 380-8.
23. Zarate, S., Pedro Romero, Rafaela Espinosa, Carlos F. Arias, and Susana López, *VP7 Mediates the Interaction of Rotaviruses with Integrin $\alpha v \beta 3$ through a Novel Integrin-Binding Site*. J. Virol., 2004. **78**(20): p. 10839.
24. Contin, R., Arnoldi F., Campagna M. and Burrone O. R, *Rotavirus NSP5 orchestrates recruitment of viroplasmic proteins*. Journal of General Virology 2010. **91**: p. 1782.
25. Arias, C., Romero P., Alvarez V. and López S, *Trypsin Activation Pathway of Rotavirus Infectivity*. J. Virol. , 1996. **70**(9): p. 5832.
26. Guerrero, C.A., Mendez E, Zarate S, Pavel I, López S, Arias A *Integrin alpha V Beta-3 mediates rotavirus cell entry*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2000. **97**: p. 14644-14649.
27. Estes, M., Graham DY., Gerba CP. and Smith EM., *Simian Rotavirus SAI Replication in Cell Cultures*. J. Virol. , 1979. **31**(3): p. 810.
28. Sue, E.C., Sharmila K. Mukherjee, Mary K. Estes, Jeffery A. Lawton, Andrea L. Shaw, Robert F. Ramig and BV. Venkataram Prasad, *Trypsin Cleavage Stabilizes the Rotavirus VP4 Spike*. J. Virol. , 2001. **75**(13): p. 6052.
29. Sánchez-San Martín, C., Tomás López, Carlos F. Arias, and Susana López., *Characterization of Rotavirus Cell Entry*. J. Virol. , 2004. **78**(5): p. 2310.
30. Gutierrez Michelle, I.P., Sánchez-San Martin Claudia, Pérez-Vargas Jimena, Espinosa Rafaela, Arias Carlos F. and López Susana., *Different Rotavirus Strains Enter MA104 Cells through Different Endocytic Pathways: the Role of Clathrin-Mediated Endocytosis*. J. Virol., 2010. **84**(18): p. 9161.
31. Kim, I., Trask SD., Babyonyshev M., Dormitzer PR., Harrison SC, *Effect of mutations in VP5* hydrophobic loops on rotavirus cell entry*. J Virol 2010. **84**(6200-6207).
32. Fuentes - Panama Ezequiel, M., López Susana, Gorziglia Mario y Arias Carlos F., *Mapping the Hemagglutination Domain of Rotaviruses*. J. Virol., 1995. **69**(4): p. 2629.
33. Guerrero, C.A., Selene Zárata, Gabriel Corkidi, Susana López and Carlos F. Arias, *Biochemical Characterization of Rotavirus Receptors in MA104 Cells*. J. Virol. , 2000. **74**(20): p. 9362.
34. Tavaría, M., Gabriele T, Kola I, Anderson RL, *A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family*. Cell Stress Chaperones, 1996. **1**: p. 23–28.
35. Morano, K., *New tricks for an old dog: the evolving world of Hsp70*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007. **1113**: p. 1-14.

36. Rojas, M., Ayala-Breton Camilo y López Susana, *Biología molecular de rotavirus: una mirada a través de la interferencia de RNA*. Mensaje Bioquímico, 2008. **32**: p. 149-162.
37. López, T., Camacho Minerva, Zayas Margarita, Nájera Rebeca, Sánchez Rosana, Arias Carlos F. and López Susana, *Silencing the Morphogenesis of Rotavirus*. J Virol., 2005. **79**(1).
38. Mitchell, D.B. and G.W. Both, *Conservation of a potential metal binding motif despite extensive sequence diversity in the rotavirus nonstructural protein NS53*. Virology, 1990. **174**(2): p. 618-21.
39. Taniguchi, K., et al., *Structure and function of rotavirus NSP1*. Arch Virol Suppl, 1996. **12**: p. 53-8.
40. Hua, J., Chen X, Patton JT, *Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding*. Journal of Virology., 1994. **68**(6): p. 3990-4000.
41. Holloway, G., Truong TT, Coulson BS, *Rotavirus antagonizes cellular antiviral responses by inhibiting the nuclear accumulation of STAT1, STAT2, and NF-kappaB*. Journal of Virology, 2009. **83**: p. 4942-4951.
42. Bagchi P, D.D., Chattopadhyay S, et al, *Rotavirus Nonstructural Protein 1 Suppresses Virus-Induced Cellular Apoptosis To Facilitate Viral Growth by Activating the Cell Survival Pathways during Early Stages of Infection*. Journal of Virology, 2010. **84**(13): p. 6834–6845.
43. Petrie, B., Greenberg HB, Graham DY, Estes MK, *Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold*. Virus Res, 1984. **1**(2): p. 133-152.
44. Maha, D.K., Xia Chen, John T. Patton, *The Rotavirus RNA-Binding Protein NS35 (NSP2) Forms 10S Multimers and Interacts with the Viral RNA Polymerase*. Virology, 1994. **202**(2): p. 803-813.
45. Taraporewala, Z., Chen D, Patton JT, *Multimers Formed by the Rotavirus Nonstructural Protein NSP2 Bind to RNA and Have Nucleoside Triphosphatase Activity*. Journal of Virology, 1999. **73**(12): p. 9934-9943.
46. Afrikanova, I., MC Miozzo, S Giambiagi, and OR Burrone, *Phosphorylation generates different forms of rotavirus NSP5*. J. Gen. Virol, 1996. **77**: p. 2059-2065.
47. Sen, A., Agresti D, Mackow ER, *Hyperphosphorylation of the Rotavirus NSP5 Protein Is Independent of Serine 67 or NSP2, and the Intrinsic Insolubility of NSP5 Is Regulated by Cellular Phosphatases*. Journal of Virology, 2006. **80**(4): p. 1807-1816.
48. Bar-Magen, T., Spencer E, Patton JT, *An ATPase Activity Associated with the Rotavirus Phosphoprotein NSP5*. Virology, 2007. **369**(2): p. 389-399.
49. Eichwald, C., Rodriguez JF, Burrone OR., *Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation*. J Gen Virol, 2004. **85**(3): p. 625-634.
50. Groft, C., Burley SK, *Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1273-1283.
51. Poncet, D., Aponte C, Cohen J, *Rotavirus protein NSP3 (NS34) is bound to the 3' end consensus sequence of viral mRNAs in infected cells*. Journal of Virology, 1993. **67**(6): p. 3159-3165.
52. Vende, P., Piron M, Castagné N, Poncet D, *Efficient Translation of Rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' End*. Journal of Virology, 2000. **74**(15): p. 7064-7071.

53. Poncet, D., Aponte C, Cohen J, *Structure and function of rotavirus nonstructural protein NSP3*. Arch Virol Suppl, 1996. **12**(29): p. 29-35.
54. Imataka, H., Gradi A, Sonenberg N, *A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation*. The EMBO Journal, 1998. **17**(24): p. 7480-7489.
55. Montero, H., Arias Carlos F and Lopez Susana *Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 Is Not Required for Viral Protein Synthesis*. Journal of virology 2006. **80**(18): p. 9031–9038.
56. Mossel, E., Ramig RF, *Rotavirus Genome Segment 7 (NSP3) Is a Determinant of Extraintestinal Spread in the Neonatal Mouse*. Journal of Virology, 2002. **76**(13): p. 6502-6509.
57. Boshuizen, J.A., et al., *Rotavirus enterotoxin NSP4 binds to the extracellular matrix proteins laminin-beta3 and fibronectin*. J Virol, 2004. **78**(18): p. 10045-53.
58. Au, K., Chan WK, Burns JW, Estes MK, *Receptor activity of rotavirus nonstructural glycoprotein NS28*. Journal of Virology, 1989. **63**(11): p. 4553-4562.
59. Hyser, J.M., et al., *Rotavirus disrupts calcium homeostasis by NSP4 viroporin activity*. MBio, 2010. **1**(5).
60. Brunet, J.P., et al., *Rotavirus infection induces an increase in intracellular calcium concentration in human intestinal epithelial cells: role in microvillar actin alteration*. J Virol, 2000. **74**(5): p. 2323-32.
61. Lorrot M and Vasseur M, *How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea?* Virol J 2007. **4**: p. 31-31.
62. Buccigrossi, V., Laudiero G, Russo C, Miele E, Sofia M, Monini M, Ruggeri FM, Guarino A, *Chloride secretion induced by rotavirus is oxidative stress-dependent and inhibited by Saccharomyces boulardii in human enterocytes*. PLoS One 2014. **9**: p. e99830.
63. Samaniego-Hernandez, M., et al., *Expression and purification of rotavirus proteins NSP5 and NSP6 in Escherichia coli*. Cell Biochem Biophys, 2006. **44**(3): p. 336-41.
64. Rainsford, E.W. and M.A. McCrae, *Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11*. Virus Res, 2007. **130**(1-2): p. 193-201.
65. Holloway, G., et al., *Rotavirus NSP6 localizes to mitochondria via a predicted N-terminal alpha-helix*. J Gen Virol, 2015.
66. Walsh D and Mohr I, *Viral subversion of the host protein synthesis machinery*. Nat Rev Micro, 2011. **9**: p. 860-875
67. Guerrero, C.A., Pardo Paula, Rodriguez Victor, Guerrero R. Rafael and Acosta Orlando, *Inhibition of rotavirus ECwt infection in ICR suckling mice by N-acetylcysteine, PPARγ and COX-2 inhibitors*. Submitting Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2013.
68. Ghosh, S., May M. J., Kopp EB, *NFκB and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses*. Annu. Rev. Immunol, 1998. **16**: p. 225-260.
69. Li, Q., Verma IM, *NF-kappaB regulation in the immune system*. Nat Rev Immunol., 2002. **10**: p. 735-34.
70. Bonizzi, G., Karin M., *The two NFκB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**: p. 280-88.
71. Memet, S., *NFκB functions in the nervous system: From development to disease*. Biochem. Pharmacol., 2006. **72**: p. 1180-1195.
72. Hayden, M.S., *Signaling to NFκB*. Genes Dev, 2004. **18**: p. 2195-2224.
73. Amir, R.E., Iwai, K., and Ciechanover, A, *The NEDD8 pathway is essential for SCF(β-TrCP)-mediated ubiquitination and processing of the NF-κ B precursor p105*. J. Biol. Chem, 2002. **277**: p. 23253-23259.

74. Ben-Neriah, Y., *Regulatory functions of ubiquitination in the immune system*. Nat. Immunol., 2002. **3**: p. 20-26.
75. Israel, A. *Biochemical and genetic analysis of the NF- κ B signaling pathway*. in *In Keystone Symposium on NF- κ B: Biology and pathology*. 2004. Keystone Symposia, Snowbird Resort, Snowbird, UT.
76. Krishnan, A., Nair SA , Pillai MR, *Biología de los PPAR gamma en el cáncer: una revisión crítica de las lagunas existentes. Biology of PPAR gamma in cancer: a critical review on existing lacunae*. . Curr Mol Med., 2007. **7**(6): p. 532-540.
77. Fajas, L., Debril M.B., Auwerx J, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis*. Journal of Molecular Endocrinology 2001. **27**: p. 1-9.
78. Mangelsdorf, D., Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM, *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. cell, 1995. **83**(6): p. 835-839.
79. Kliewer, S., Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC and Lehmann JM *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. cell, 1995. **83**: p. 813-819.
80. Lehmann, J., Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA, *Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs*. J Biol Chem 1997. **272**: p. 272: 3406–3410.
81. Stumvoll, M., Häring H. , *Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms*. Ann Med, 2002. **34**(3): p. 217-224.
82. Chinetti, G., Fruchart JC, Staels B, *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation*. Inflamm Res, 2000. **10**: p. 497-505.
83. Delerive, P., Fruchart JC, Staels B, *Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control*. J Endocrinol, 2001. **169**(3): p. 453–459.
84. Acosta, P., López Segovia, Blé Castillo, A Rodríguez Hernández, D Muñoz Romero, E Acosta Nieto, *Effect of Rosiglitazone and Pioglitazone in combination with Metformin in the control of Diabetes Mellitus type 2*. Universidad y Ciencia, 2005. **21**(41): p. 11-17.
85. Wikimedia Foundation Inc. *Pioglitazone*. 2012 <http://en.wikipedia.org/wiki/Pioglitazone>].
86. Tegeder, I., Pfeilschifter J, Geisslinger G, *Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors*. The Fased, 2001. **15**: p. 2057-2072.
87. Little, D., Jones S L, Blikslager AT, *Cyclooxygenase (cox) inhibitors and the intestine*. J Vet Intern Med, 2007. **21**: p. 367–377.
88. Youssef, M.B., *Role of peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control*. J Biomed Biotechnol, 2004. **29**(3): p. 156-166.
89. Bassaganya-Riera, J., Song R, Roberts PC, Hontecillas R, *PPAR-gamma activation as an anti-inflammatory therapy for respiratory virus infections*. Viral Immunol, 2010. **23**: p. 343-352.
90. Liu, J., Xia Q, Zhang Q, Li H, Zhang J, Li A, Xiu R, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 and pioglitazone inhibit hydroxyl peroxide-induced TNF-alpha and lipopolysaccharide-induced CXC chemokine expression in neonatal rat cardiac myocytes*. Shock 2009. **32**: p. 317-324.

91. Li, M., Pascual G, Glass CK, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Dependent Repression of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene*. Mol Cell Biol, 2000. **20**: p. 4699-4707.
92. Jiang, C., Ting AT, Seed B, *PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines*. Nature, 1998. **391**: p. 82-86.
93. Polvani, S., Tarocchi M, Galli A, *PPARgamma and Oxidative Stress: Con(beta) Catenating NRF2 and FOXO*. PPAR Res 2012,. **2012**: p. 641087.
94. Okuno, Y., Matsuda M, Miyata Y, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M, Shimomura I, *Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse*. Endocr J 2010. **57**: p. 303-309
95. Ren, Y., Sun C, Sun Y, Tan H, Wu Y, Cui B, Wu Z, *PPAR gamma protects cardiomyocytes against oxidative stress and apoptosis via Bcl-2 upregulation*. Vascul Pharmacol, 2009. **51**: p. 169-174.
96. Morgan MJ and Liu ZG, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. Cell Research 2011. **21**: p. 103-115.
97. Wu, Z., et al., *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. cell, 1999. **98**(1): p. 115-24.
98. Liang, H. and W.F. Ward, *PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism*. Adv Physiol Educ, 2006. **30**(4): p. 145-51.
99. Summermatter, S., et al., *Remodeling of calcium handling in skeletal muscle through PGC-1alpha: impact on force, fatigability, and fiber type*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(1): p. C88-99.
100. Viatour, P., et al., *Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(1): p. 43-52.
101. Harris, C.D., G. Ermak, and K.J. Davies, *Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(21): p. 2477-86.
102. Olesen, J., et al., *Skeletal Muscle PGC-1 α Is Required for Maintaining an Acute LPS-Induced TNF α Response*. PLOS One, 2012. **7**(2).
103. Brault, J.J., J.G. Jespersen, and A.L. Goldberg, *Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator 1 α or 1 β Overexpression Inhibits Muscle Protein Degradation, Induction of Ubiquitin Ligases, and Disuse Atrophy*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19460-71.
104. Guerrero, C.A., Murillo A. y Acosta O, *Inhibition of rotavirus infection in cultured cells by N-acetyl-cysteine, PPAR γ agonists and NSAIDs*. Antiviral Res, 2012. **96**(1): p. 1-12.
105. Guerrero, C.A., Guerrero R. Rafael and Acosta Orlando, *N-acetyl-cysteine: an efficient and safe treatment for rotavirus-associated diarrhoea in children*. Pharmacotherapy, 2014. **34**(11): p. e333-340.
106. Rainsford Edward W and McCrae Malcolm A, *Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11*. Virus Research, 2007. **130**(1-2): p. 193–220.
107. Patton, J., Silvestri LS, Tortorici MA, Vasquez-Del Carpio R, Taraporewala ZF, *Rotavirus genome replication and morphogenesis: role of the viroplasm*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **309**: p. 169-187.
108. Samaniego-Hernández, M., León-Rodríguez A, Aparicio-Fabre R *Expression and purification of rotavirus proteins NSP5 and NSP6 in Escherichia coli*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2006. **44**(3): p. 336-341.

109. Browne, E.P., Bellamy A. Richard and Taylor John A, *Membrane-destabilizing activity of rotavirus NSP4 is mediated by a membrane-proximal amphipathic domain*. Journal of General Virology, 2000. **81**: p. 1955–1959.
110. Tian, P., Estes MK, Hu Y, Ball JM, Zeng CQ, Schilling WP, *The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum*. Journal of Virology, 1995. **69**(9): p. 5763-5772.
111. Taylor, R.G., Walker D. C. and McInnes R. R, *E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing*. Nucleic Acids Res., 1993. **21**: p. 1677 -1678.
112. Moreno Luz Yurany, G.C.A., Acosta Orlando, *Expression and purification of rotavirus structural proteins VP5* and VP8* in bacteria E. coli BL21(DE3)*. Rev. Colomb. Biotecnol, 2013. **15**(1): p. 82-97.
113. *Estatuto Nacional de Protección de los Animales in Ley 84*. 1989: Republica de Colombia.
114. Ruiz-Palacios Guillermo, M., Pérez-Schael Irene and co., *Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe Rotavirus gastroenteritis*. The New England Journal of Medicine, 2006. **354**(1): p. 11-22.
115. Zhang, B., et al., *Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(11): p. 1457-66.
116. Michael, K., *How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex*. Oncogene, 1999. **18**: p. 6867–6874.
117. Gómez Dory L, *Evaluación de la expresión de las proteínas PPAR γ y NF κ B en vellosidades intestinales de ratones adultos ICR infectados con Rotavirus ECwt y tratados con pioglitazona*, in Facultad de Medicina. 2013, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 1-113.
118. Calderón, M.N., Guzmán Fanny, Acosta Orlando, Guerrero Carlos A *Rotavirus VP4 and VP7-derived synthetic peptides as potential substrates of protein disulfide isomerase lead to inhibition of rotavirus infection*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2012. **18**(4): p. 373-382.
119. Rossen John, W., Bouma Janneke, Rolien H C Raatgeep, Hans A Büller, Alexandra WC Einerhand, *Inhibition of Cyclooxygenase Activity Reduces Rotavirus Infection at a Postbinding Step*. J Virol. , 2004. **78**(18): p. 9721-9730.
120. Nandi, S., Chanda, S., Bagchi, P., Nayak, M. K., Bhowmick, R. and Chawla-Sarkar, M., *MAVS protein is attenuated by rotavirus nonstructural protein 1*. PloS one, 2014. **9**(3): p. e92126.
121. Izabel J. M. Di Fiore, J.A.P., Gavan Holloway, Barbara S. Coulson, *NSP1 of human rotaviruses commonly inhibits NF- κ B signalling by inducing β -TrCP degradation*. Journal of Virology 2015. **96**(7): p. 1768–1776.
122. Matthieu Gratia, E.S., Patrice Vende, Annie Charpilienne, Carolina Hilma Baron, Mariela Duarte, Stephane Pyronnet, Didier Ponceta, *Rotavirus NSP3 Is a Translational Surrogate of the Poly(A) Binding Protein-Poly(A) Complex*. Journal of Virology, 2015 **89**(17): p. 8773-8782.
123. Ball, K.A.Y.Z.D.F.J.M., *Rotaviruses: Extraction and Isolation of RNA, Reassortant Strains, and NSP4 Protein*. Current Protocols in Microbiology, 2015. **37**(1): p. 15C.6.1-15C.6.44.
124. Yakshe, K.A., *Functional Analysis of Interactions of Rotavirus NSP4 with Caveolin-1, Cyclophilin A, Cyclophilin 40, Heat Shock Protein 56, and Cholesterol*. Doctoral dissertation, Texas A & M University., 2015: p. 1-217.

125. Jeanette M. Criglar, L.H., Sue E. Crawford, Joseph M. Hyser, James R. Broughman, B. V. Venkataram Prasad, Mary K. Estes, *A Novel Form of Rotavirus NSP2 and Phosphorylation-Dependent NSP2-NSP5 Interactions Are Associated with Viroplasm Assembly*. Journal of Virology, 2013. **88**(2): p. 786-798.
126. Davy Martin, M.D., Jean Lepault, Didier Poncet, *Sequestration of Free Tubulin Molecules by the Viral Protein NSP2 Induces Microtubule Depolymerization during Rotavirus Infection*. Journal of Virology 2010. **84**(5): p. 2522-2532.
127. Holloway Gavan, R.I.J., Yilin Kang, Vi T. Dang, Diana Stojanovski and Barbara S. Coulson, *Rotavirus NSP6 localizes to mitochondria via a predicted N-terminal α -helix*. Journal of General Virology, 2015. **96**: p. 3519–3524
128. Ruan, H., et al., *Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory*. Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1319-36.
129. Adams, M., et al., *Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 5128-32.
130. Camp, H.S., S.R. Tafuri, and T. Leff, *c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity*. Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 392-7.
131. Zhanquo Gao , Q.H., Bailu Peng , Paul J. Chiao and Jianping Ye *Regulation of Nuclear Translocation of HDAC3 by I κ B α Is Required for Tumor Necrosis Factor Inhibition of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Function*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(7): p. 4540-4547.
132. Carreño-Torres JJ, G.M., Arias CF, López S, Isa P, *Characterization of viroplasm formation during the early stages of Rotavirus infection*. Virology Journal, 2010. **7**(350).

12. ANEXOS

Anexo 1. Aval Ético



Bogotá, diciembre 04 de 2017

Estudiante
Dory Lineth Gómez Moreno
Instituto de Biotecnología

Respetada Estudiante:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 04 de diciembre de 2017 (Acta 14-2017), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

P12: Proyecto / Investigadores – Grupos – Dependencias / Observaciones.

Proyecto: Interacción entre proteínas relacionadas con la vía PPAR γ – NF κ B y proteínas no estructurales de Rotavirus.

Responsables: Dory Lineth Gómez Moreno (Tesis de Doctorado en Biotecnología) y Carlos Arturo Guerrero Fonseca (Profesor Director de Tesis)

Observaciones:

En esta investigación se realizarán ensayos *in vitro*, los cuales implican la utilización de cepas bacterianas de *E. coli* transformadas con plásmidos. Así mismo, se emplearán líneas celulares provenientes de proveedores comerciales certificados.

Los ensayos *in vivo* contemplan la obtención de sueros inoculando ratones ICR destetos y cobayos destetos. Estos animales serán alojados en el Laboratorio de Biología Molecular (Facultad de Medicina UN), acatando recomendaciones de la Resolución 008430 de 1993 (Minsalud) y de la Ley 84 de 1989 (Estatuto Nacional de Protección Animal). Se deberán aplicar los protocolos de bioseguridad adecuados para este tipo de experimentos. Se asume el compromiso para el entrenamiento adecuado del personal investigador en los aspectos de buen cuidado y uso de los animales de laboratorio. La manipulación de reactivos químicos y biológicos así como la disposición de sus desechos se hará acorde con los protocolos de bioseguridad contemplados en el sistema institucional de gestión ambiental.

Los investigadores declaran que "este proyecto tiene mínimo impacto ambiental y mínimo riesgo para la salud humana", y que no tienen conflictos de intereses para el desarrollo de esta Tesis. Los aspectos de Propiedad Intelectual se establecerán según los lineamientos del Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

Concepto: Avalado.

LUIS FERNANDO OSPINA G.
Coordinador Comité de Ética

14