

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIVIRAL DE *Waltheria americana* L (Standley y Steyermark, 1949) EN EL PROCESO INFECTIVO DE ROTAVIRUS HUMANO SOBRE CÉLULAS MA 104

Por

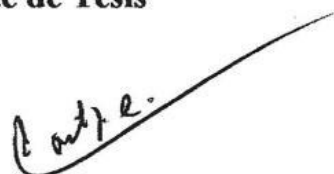
QBP. VERÓNICA LISSET LOAIZA GUTIÉRREZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS
con Acentuación en Microbiología

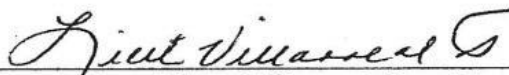
Mayo, 2014

**ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIVIRAL DE *Waltheria americana* L
(Standley y Steyermark, 1949) EN EL PROCESO INFECTIVO DE
ROTAVIRUS HUMANO SOBRE CÉLULAS MA 104**

Comité de Tesis



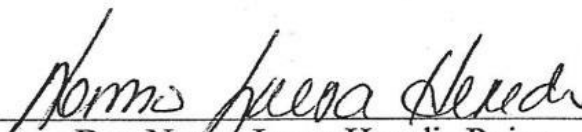
Dr. Juan Francisco Contreras C.
Director de Tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño
Secretario



Dr. José Santos García Alvarado
Vocal



Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Vocal



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal

LUGAR DE TRABAJO

El presente estudio se realizó en la Unidad de Virología del Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Contreras Cordero. Con el apoyo de PAICYT CN1074-11.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Juan Francisco Contreras *Director de tesis*, por aceptarme una vez más en su laboratorio y darme la oportunidad de avanzar como profesionista. Le agradezco la paciencia y la confianza que me fue brindada en este periodo. Sin duda, fue una gran experiencia académica y personalmente. ¡Muchas gracias por todo su apoyo!

Dra. Norma Laura Heredia Rojas, Dra. Licet Villareal Treviño, Dr. José Santos García Alvarado y Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna por conformar el *Comité de Tesis*. Les agradezco por su colaboración para la culminación de este trabajo. Asimismo les felicito por ser docentes ejemplares y personas con excelente calidad humana.

Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Especialmente a la *directora de la instalación*, Dra. María Cristina Rodríguez Padilla por brindar el apoyo necesario para realizar este trabajo de tesis.

Subunidad de Estudios de Posgrado, por su amable atención y orientación. Además agradezco a todo el personal docente con quienes tuve la oportunidad de cursar mis materias de maestría.

A los compañeros estudiantes de posgrado con quienes tuve la oportunidad de compartir un salón de clases o sesiones de seminarios. En especial a Claudia E. Cerda Armijo, me enseñaste que la tenacidad y el esfuerzo siempre son recompensados en la vida. ¡Mucho éxito!

Asimismo, agradezco el apoyo de CONACyT y PAICYT, por la oportunidad de estudio y las facilidades económicas proporcionadas.

Gracias a la Dra. Griselda Menchaca *compañera de laboratorio de la Unidad de Virología L-11*, por brindar el apoyo y los consejos que en gran medida se ven reflejadas

en la culminación de esta tesis. Siempre es un gusto conocer personas con gran dedicación a su trabajo y esa admiración a la ciencia. ¡Mil gracias!

Sr. Fernando Loaiza, Sra. Rosario Gutiérrez, Fernanda Loaiza, Alicia Garza, y Carlos Loaiza *mi familia*, quienes siempre me han apoyado en todas mis decisiones. Estaré siempre agradecida con ustedes por todo lo que han hecho por mí. Son un gran ejemplo en mi vida y los amaré siempre.

Edgar Alberto Herrera Martínez *mi gran apoyo*, te agradezco por ser esa excelente persona que jamás imaginé tener a mi lado. Por estar pendiente de los avances en esta etapa de mi vida, por siempre estar dispuesto a ayudar y por tu lucha incansable en hacerme feliz. Espero que sigamos logrando nuestras metas e ilusiones juntos. ¡Gracias!

A mis amigos: Esas personas que siempre estuvieron a mi lado cuando las necesité. Quienes se encargaron de mermar mis preocupaciones y sacarme una sonrisa. Aquellas personas que me siguen dando la oportunidad de crecer con ellos, compartiendo experiencias y emociones. Esas personas especiales en mi vida... ¡Los quiero muchísimo!

Gracias a todos los que de alguna manera me brindaron su apoyo durante el curso del posgrado, así como para la realización de este trabajo de tesis para obtener mi acentuación en Microbiología.

Verónica Lisset Loaiza Gutiérrez

Para aquellas personas que son mi motivación y que siempre estarán en mi corazón. Ustedes me apoyaron a subir un peldaño más en la historia de mi vida, les agradezco infinitamente por creer en mí. Con todo mi cariño, esta tesis está dedicada a ustedes:

Mi sobrina

Alicia Garza

Mis padres:

Fernando Loaiza

Rosario Gutiérrez

Mis hermanos:

Fernanda Loaiza

Carlos Loaiza

Especialmente:

Edgar Alberto Herrera Mtz.

ÍNDICE

1. LUGAR DE TRABAJO	I
2. AGRADECIMENTOS.....	II
3. DEDICATORIA.....	IV
4. INDICE.....	V
5. INDICE DE TABLA Y FIGURAS.....	VII
6. NOMENCLATURAS.....	IX
7. INTRODUCCIÓN.....	1
8. ANTECEDENTES.....	3
12.1. Generalidades de Rotavirus	3
12.2. Ciclo replicativo	4
12.3. Epidemiología	7
12.4. Métodos de control y tratamiento	8
12.5. Situación actual: búsqueda de alternativas	10
12.6. <i>Waltheria americana</i> L.	11
9. JUSTIFICACIÓN.....	16
10. HIPÓTESIS.....	17
11. OBJETIVOS.....	18
12. METODOLOGÍA.....	19
13.1. Cultivo celular	19
13.2. Propagación de las cepas DS-1 y Wa en células MA 104	19
13.3. Microtitulación de focos infecciosos	20
13.4. Cuenta de focos infecciosos	21
13.5. Multiplicidad de infección	22
13.6. Obtención de extractos acuosos	22
13.7. Obtención de extractos hidro-etanólicos	23
13.8. Evaluación de citotoxicidad con extractos acuosos e hidro-etanólicos	23

13.9. Evaluación del potencial antiviral de los extractos	24
13.10. Efecto de los extractos sobre la partícula infectiva de rotavirus	25
13.11. Análisis de RNA genómico	26
13.12. Efecto anti-rotavirus en la producción de proteínas virales	27
13.13. Obtención de proteínas NSP2 recombinantes	28
13.14. Producción de anti—NSP2 en conejos: Esquema de inmunización	33
13. RESULTADOS.....	34
13.1. Cultivo celular	34
13.2. Propagación de las cepas DS-1 y Wa en células MA 104	35
13.3. Obtención de extractos acuosos e hidro-etanólicos	36
13.4. Evaluación de citotoxicidad con extractos acuosos e hidro-etanólicos	37
13.5. Evaluación del potencial antiviral de los extractos	38
13.6. Efecto de los extractos sobre la partícula infectiva de rotavirus	42
13.7. Análisis de RNA genómico	43
13.8. Obtención de proteínas NSP2 recombinantes	47
13.9. Efecto anti-rotavirus en la producción de proteínas virales	53
14. DISCUSIÓN.....	58
15. CONCLUSIÓN.....	65
16. BIBLIOGRAFÍA.....	66
17. APÉNDICE I: Protocolos.....	77
18. APÉNDICE II: Soluciones de trabajo.....	87
19. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

1. Programación de temperaturas para RT-PCR del gen 8 de rotavirus 29

ÍNDICE DE FIGURAS

1. *Waltheria indica* L. 12
2. Línea de incubación de la infección de células MA 104 con rotavirus humano..... 25
3. Desarrollo de un cultivo celular en vial de 25 cm² observada a través de un microscopio invertido 20x 34
4. Propagación de rotavirus humano y su titulación mediante tinción con inmunoperoxidasa 35
5. Ejemplar de *W. americana* L. de forma comercial 36
6. Rendimiento en peso de los extractos pulverizados a partir de 500 ml de extracto primario 36
7. Efecto citotóxico de los extractos sobre células MA 104 mediante microscopía 20x 38
8. Porcentajes de inhibición de focos infecciosos detectados con anti-Wa en presencia de extractos acuosos e hidro-etanólicos antes o después de la infección 39
9. Reducción de focos infecciosos en las mínimas concentraciones efectivas obtenidas para cada tipo de extracción y tratamiento 40
10. Porcentajes de inhibición de focos infecciosos detectados con anti-VP8* en presencia de extractos acuosos e hidro-etanólicos antes de la infección 41
11. Distribución de las muestras en la placa de ELISA para evaluar el reconocimiento de rotavirus pre-tratado con extractos..... 42
12. Absorbancias obtenidas en ELISA con rotavirus pre-tratado con extractos 43
13. Síntesis de RNA de rotavirus DS-1 (MI 0.1) a diferentes tiempos de incubación en ausencia de extracto 44

14. Síntesis de RNA de rotavirus DS-1 (MI 0.1) a diferentes tiempos de incubación en presencia de extracto	45
15. Síntesis de RNA de rotavirus DS-1 (MI 0.1) a diferentes tiempos exposición con el extracto hidro-etanólico	46
16. Segunda extracción con método Trizol de los lisados con los diferentes tratamientos a diferentes tiempos de exposición con el extracto	46
17. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del fragmento 8 de rotavirus.....	47
18. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de digestión enzimática entre el fragmento 8 de rotavirus y el plásmido de clonación.....	48
19. Cromatograma de la secuencia nucleotídica obtenida por secuenciación del fragmento 8 clonado de rotavirus	49
20. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del segmento 8 de rotavirus humano DS-1 obtenido en la secuenciación	50
21. Productos de digestión enzimática entre el plásmido de expresión y el fragmento 8 de rotavirus	51
22. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% a partir de PCR confirmatoria para la ligación del plásmido de expresión y el fragmento 8 de rotavirus	51
23. SDS-PAGE 11% a partir de los extractos bacterianos transformados	52
24. SDS-PAGE 11% a partir de las fracciones de NSPr obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad	53
25. Western blot utilizando anti-VP8* de rotavirus Wa como anticuerpo de detección en lisados con ausencia o presencia de extracto	54
26. Western blot de lisados virales en presencia o ausencia de extracto utilizando anti-DS-1 para su detección	55
27. Western blot de la producción de proteínas virales de rotavirus DS-1 (MI 0.1) a diferentes tiempos de exposición con extracto hidro-etanólico.....	56

NOMENCLATURAS

% Por ciento

μM micromoles

ABTS 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-ácido sulfónico)

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

BL21 (DE3) Cepa de *E. coli* modificada para la expresión de péptidos recombinantes

CC50 Concentración Citolóxica 50%

CMT Concentración Máxima de Tolerancia

CO₂ Dióxido de Carbono

DH5α Cepa de *E. coli* modificada para la clonación de plásmidos sintéticos

D-MEM Medio de Eagle modificado de Dulbecco's

EDTA Ácido etilendiaminotetracético

Hpi Horas post-infección

HRP Peroxidasa de rábano

IPTG Isopropil β-D-1-thiogalactopyranosido

kDa Unidad de medida para proteínas (kilo Dalton)

LB Luria-Bertoni

M Mol

MA 104 Células embrionarias de riñón de mono verde africano

mA miliamperios

MEM Medio esencial mínimo

mg Miligramo

ml Mililitro

mM Milimoles

nm Nanómetros

NSPr Proteína NSP2 recombinante

°C Grados Centígrados

OMS Organización Mundial de la Salud

PBS A Buffer de fosfatos salino sin calcio ni magnesio

PBS Buffer de Fosfatos Salino

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH Potencial de hidrógeno ($-\log[H^+]$)

rpm Revoluciones por minuto

RT Retro-transcripción

SDS Dodecil sulfato de Sodio

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

SFB Suero Fetal de Bovino

SOC Medio enriquecido para bacterias calcio competentes

TBS Buffer salino de Tris

TEMED N,N,N,'N,'-Tetrametil-etilendiamina

UFF Unidades Formadoras de Focos

VP Proteínas virales

X Unidad de concentración final en soluciones de trabajo a partir de una concentración conocida de stock (1X, 5X, 10X).

µg Microgramo

µl Microlitro

RESUMEN

Considerado como el principal agente causal de la gastroenteritis viral, rotavirus es un grave problema de salud mundial. Cada año, se registran alrededor de medio millón de muertes, siendo los países en vías de desarrollo donde los decesos se presentan con mayor frecuencia. A pesar de los estragos que dichos virus ocasionan, el tratamiento actual de la enfermedad se basa primordialmente en la rehidratación del paciente. Numerosos esfuerzos por prevenir y controlar los brotes anuales, han derivado en el surgimiento de dos vacunas: Rotarix™ (GSK) y RotaTeq™ (Merck). Sin embargo, debido a la característica segmentada del genoma, pueden presentarse intercambios génicos entre diferentes cepas de rotavirus durante co-infecciones. Asimismo durante la replicación del genoma, pueden presentarse recombinaciones génicas y mutaciones por la polimerasa viral de baja fidelidad. Todo esto promueve el surgimiento de nuevas cepas posiblemente más patógenas en donde la pre-inmunización actual se torne ineficiente. De este modo, la búsqueda de alternativas eficaces para asistir en el tratamiento y prevención de las infecciones por rotavirus continúa vigente. En este sentido, un enfoque hacia la utilización de extractos de plantas con actividad terapéutica representa una alternativa costeable, sencilla y natural para complementar el tratamiento de la diarrea viral. En el presente proyecto, extracciones acuosas e hidro-etanólicas de *W. americana* demostraron efectividad anti-rotavirus al reducir la producción de focos infecciosos. Asimismo, se analizó el efecto anti-rotavirus de las extracciones en etapas tempranas del ciclo replicativo. Se observó que los extractos no afectan la adhesión viral permitiendo el ingreso del virus a la célula hospedera. Sin embargo, una disminución de RNA genómico y síntesis de proteínas virales fueron observados. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la actividad antiviral de la planta puede originarse en la etapa de post-infección viral.

ABSTRACT

Considered the main causative agent of viral gastroenteritis, rotavirus is a major global health problem. Each year, about half a million of global deaths are recorded, while the developing countries are presents most frequently. Despite the havoc that these viruses cause, the current treatment of the disease is based primarily on the rehydration of the patient. Numerous efforts to prevent and control outbreaks annually have derived two vaccines: Rotarix™ (GSK) and RotaTeq™ (Merck). However, due to the segmented genome feature, genetic exchanges can occur between different strains of rotavirus during coinfection. Additionally during genome replication, genetic recombination and mutation can occur because a low fidelity polymerase. All this promotes the emergence of new possibly most pathogenic strains where the current pre-immunization becomes inefficient. Thus, the search for effective alternatives to assist in the treatment and prevention of rotavirus infections are still necessary. Here, an approach to the use of plant extracts with therapeutic activity represents a cheaper, simple and natural alternative to complement the treatment of viral diarrhea. In this project, hydro alcoholic and aqueous extractions of *W. americana* against rotavirus demonstrated effectiveness to inhibit the production of infectious foci. Also, the anti-rotavirus effect of extractions was analyzed on the early replicative cycle. It was observed that the extracts do not affect viral attachment allowing the entry of the virus into the host cell. However, a decrease of genomic RNA and viral protein synthesis were observed. Therefore, the results suggest that the antiviral activity of the plant may arise after viral infection.

INTRODUCCIÓN

Rotavirus del grupo A se presenta frecuentemente en niños menores de 5 años, manifestando desde infecciones asintomáticas hasta diarreas graves que conllevan a deshidrataciones mortales (Payne, 2011). Las infecciones presentan un patrón estacional, observándose los picos más altos en temporadas de invierno. Su vía de transmisión es fecal-oral, siendo favorecida en zonas de aglomeración como guarderías, parques y escuelas (Marshal, 2009). A la fecha, la gastroenteritis por rotavirus es calificada como un problema grave de salud a nivel mundial registrando cerca de 600 000 muertes por año (Organización Panamericana de la Salud, 2010; Comité Nacional de Infectología, 2006).

A pesar de los trastornos que dichos virus ocasionan, la gastroenteritis por rotavirus carece de tratamiento específico. La atención al paciente es sintomática y se basa fundamentalmente en una rehidratación oportuna (Estés, 2007). Asimismo, se han realizado cuantiosos esfuerzos por disminuir los brotes anuales, tal es el caso del desarrollo de vacunas con base en las cepas más recurrentes (Perez, 2012). Sin embargo, aunque éstas demuestren efectividad en la prevención de las infecciones, los efectos secundarios y su efectividad en países con alto riesgo de enfermedad continúan en vigilancia (Hyung-Jun *et al.*, 2010; Tate *et al.*, 2012).

La razón de la evaluación constante de dichas vacunas radica en la variabilidad antigénica de rotavirus. Durante una infección, existe la posibilidad de intercambiar segmentos génicos entre diferentes cepas de rotavirus. Esto debido a la característica segmentada de su material genético. Además, las mutaciones originadas durante la replicación del genoma por una polimerasa de baja fidelidad y las recombinaciones génicas favorecen la aparición de nuevas cepas víricas con características antigénicas diferentes (Estes y Kapikian, 2001; Infante-Ramírez R. *et al.*, 2007).

Debido a esto, alternativas que contribuyan al tratamiento y prevención de los brotes por rotavirus son necesarias. Principalmente en la búsqueda de compuestos químicos

capaces de inhibir el proceso de infección viral de forma no inmunológica. El descubrimiento de productos naturales con baja toxicidad obtenidos de plantas es un claro ejemplo de ello, además de representar una estrategia alternativa promisoriosa en el control de la gastroenteritis viral (Hyung-Jun *et al.*, 2010; Savi *et al.*, 2010).

Existen estudios en donde se ha demostrado la capacidad anti-rotavirus de determinados compuestos extraídos de plantas con resultados alentadores. Sin embargo, es necesario continuar con sus evaluaciones para obtener resultados concluyentes y el análisis de sus efectos *in vivo*, debido a que ninguno de ellos se encuentra disponible para el tratamiento contra rotavirus (Takahashi *et al.*, 2001; Andres *et al.*, 2007; Roner *et al.*, 2010; Hyung-Jun *et al.*, 2010; Chingwaru *et al.*, 2011).

Sin embargo, al considerar la gran variedad global de plantas terapéuticas, la mayoría de ellas carecen de estudios que avalen sus propiedades. Tal es el caso de *W. americana*, una hierba nativa del Nuevo Mundo de la cual se mencionan propiedades febrífugas, emolientes, tónicas, analgésicas y astringentes (Burkill, 2000; Heike, 2010). Estudios donde se demuestra el efecto antimicrobiano de *W. americana* han sido descritos (Olajuyigbe, 2011). Sin embargo, se han reportado escasos estudios donde se demuestren sus propiedades antivirales (Zongo *et al.*, 2013).

En nuestro país, esta planta es ampliamente utilizada de forma empírica para el tratamiento de desórdenes digestivos. En el presente estudio, la actividad antiviral de extractos naturales acuosos e hidro-etanólicos de *W. americana* fue evaluada. Se estudiaron diferentes etapas de replicación utilizando dos cepas de rotavirus humano con genotipo G1P[8] y G2P[4] en células MA 104. El estudio incluyó las evaluaciones del efecto antiviral en cuanto a la adherencia viral, su efecto en la producción de proteínas virales y síntesis de genoma viral. Los resultados de dicha investigación proporcionaron evidencia *in vitro* de la actividad de *W. americana* que aportan nuevos conocimientos para un tratamiento alternativo contra la diarrea aguda viral en infantes.

ANTECEDENTES

Generalidades de rotavirus

Rotavirus fue descrito por primera vez en 1973 por Ruth Bishop, quien describió la presencia de partículas virales en el duodeno de niños con gastroenteritis. Por su forma similar a una rueda de carreta, se le propuso el nombre de rotavirus del latín *rota* que significa rueda (Bishop *et al.* 1973). Años después, dicho virus fue considerado como principal agente causal de enfermedades diarreicas infecciosas animales y humanos (Estés and Kapikian, 2007).

Perteneciente a la familia *Reoviridae*, el virus posee aproximadamente 75 nm de diámetro y su estructura icosaédrica carece de envoltura lipídica, lo que le confiere resistencia a ciertos solventes. Dicho virus, posee dentro de su estructura las enzimas necesarias para su replicación. Su genoma está constituido por 11 segmentos de RNA de doble cadena, cada segmento génico codifica una sola proteína, a excepción del segmento 11 que codifica para dos proteínas no estructurales. (Estes and Kapikian, 2001; Rojas *et al.* 2008).

La estructura vírica está compuesta por tres capas concéntricas de proteínas. En su capa interna se encuentra la proteína VP2 la cual permanece en contacto con la polimerasa VP1 y el genoma viral. La capa intermedia está conformada por la proteína VP6 cuyas características inmunogénicas permiten clasificar a rotavirus en 8 grupos (A-H). Los grupos de la A - C se han aislado tanto en animales como en humanos, y el resto de los grupos predominan en animales (Payne *et al.* 2011; Patton 2012).

En la capa externa se encuentran las proteínas VP4 y VP7, las cuales son las responsables de las primeras interacciones con la célula hospedero. Estas dos proteínas definen el serotipo del virus y se consideran esenciales para el desarrollo de vacunas debido a que son los objetivos para anticuerpos neutralizantes. VP7 es asignado con el serotipo G debido a su naturaleza glicosilada, y a la proteína VP4 le corresponde el

serotipo P debido a su susceptibilidad a proteasas (Estes and Kapikian, 2007; Comité Nacional de Infectología 2006; Payne *et al.* 2011).

La característica segmentada del genoma de rotavirus, favorece la presencia de re arreglos génicos durante coinfecciones. Debido a esto, es posible encontrar homología genética entre ciertas cepas animales y cepas humanas. En donde uno o más genes de cepas animales se intercambian con genes de rotavirus humano durante el proceso de replicación y ensamblaje viral, brindándoles un efectivo mecanismo evolutivo para el surgimiento de nuevas cepas (Müller and Johne, 2007; Payne *et al.* 2011). Sin embargo, los serotipos de las cepas animales aun difieren de las cepas humanas prevalentes.

Ciclo replicativo

La infección por rotavirus se inicia en las zonas apicales de las vellosidades del intestino delgado. Por lo tanto, esta selectividad presupone que los enterocitos poseen receptores celulares específicos que permiten la interacción virus-célula (Rojas *et al.* 2008). Sin embargo, la identificación receptores específicos para rotavirus continúa inconcluso. Se ha descrito que la etapa de reconocimiento celular se lleva a cabo por un proceso donde intervienen varios receptores celulares, tales como integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ y a la proteína hsc70; además la presencia de microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos (Arias 2001; López and Arias 2004; Isa *et al.* 2004).

En la primera etapa del ciclo, se efectúan los procesos de adhesión y penetración. En la actualidad, se proponen dos mecanismos para el ingreso de rotavirus a la célula hospedera: vía endocitosis o penetración directa, un mecanismo similar al de un virus envuelto (Arias *et al.* 2001; Settembre *et al.* 2011). En dicha etapa, los virus maduros contienen tres capas proteicas concéntricas y son comúnmente denominadas “partículas de triple capa” o TLP’s (Settembre *et al.* 2011).

VP4 es una de las proteínas estructurales que forma parte de la capsida externa del virus con 120 copias por partícula viral (Pesavento, 2006). Esta proteína le proporciona infectividad al virus el cual es potenciado por la acción de proteasas (Settembre, *et al.* 2011). Este procesamiento enzimático conduce a un cambio conformacional que da lugar a dos subunidades proteicas: VP5* y VP8*. La exposición de las subunidades permite la facilidad de interacción con los receptores celulares y la penetración mediante una cascada de eventos que involucran la alteración de la estabilidad en la capsida externa (Settembre *et al.* 2011).

Se ha observado que VP4 está involucrada en la especificidad de hospedero, debido a que es el primer contacto virus-célula antes de la penetración (Feng, *et al.* 2011). Durante el ciclo de replicación, esta proteína es adquirida poco antes de la salida del virus al medio extracelular. Incluso, se sugiere que posee una función durante la liberación del virus (Nejmeddine, *et al.* 2000; Sapin, *et al.* 2002). Asimismo, formando gran parte de la cápsida externa de rotavirus se encuentra VP7 (Ayala-Breton, 2009). Es una proteína estructural producida y glicosilada en el retículo endoplásmico rugoso durante el ciclo replicativo del virus (Pesavento, *et al.* 2006). Su función principal es estructural, confiriendo estabilidad a la partícula icosaédrica infectiva y manteniendo contacto con las proteínas VP4 y VP6.

Durante el ciclo de replicación por rotavirus, es posible observar mediante microscopía electrónica una serie de transformaciones moleculares que sufre la partícula viral. Una vez que logra acceder al citoplasma, variaciones en la concentración de calcio provocan la pérdida de la capa externa originando una partícula de doble capa conformada por la proteína VP6 como cubierta externa (Ayala-Breton, *et al.*, 2009). Dicha proteína, es una de las más abundantes en la partícula viral con 780 copias por partícula (Pesavento, *et al.* 2006). Se encuentra formando la capa intermedia del virus completo y confiere estabilidad a la estructura icosaédrica (Ruiz, *et al.* 2009). Durante el ciclo de replicación se co-localiza con NSP5 en la periferia de los viroplasmos (Silvestri, *et al.* 2004).

En esta etapa del ciclo, se efectúa la producción de proteínas virales y replicación de material genético. En donde es necesaria la activación de la RNA polimerasa (VP1) para que comience la producción tanto de RNAm como de cadenas complementarias a estas (Estes and Kapikian, 2001; Patton *et al.* 2007). La replicación de RNAm y RNA complementario se efectúa dentro de la nucleocápside y son liberadas al exterior a través de poros que se forman entre las capas de VP6 y VP2. Una vez transcritos, los RNAm sufren modificaciones post-transcripcionales gracias a la proteína estructural VP3. Dichas modificaciones les permite ser traducidos por la maquinaria celular (Contin, *et al.*, 2011).

A partir de 4 a 8 horas posteriores a la infección, es posible observar por microscopía electrónica, una masa electrodensa característica de las infecciones por rotavirus (Arias 2001; Rojas *et al.* 2008). Dicha masa es denominada “viroplasma”, la cual consiste en la acumulación de proteínas virales (VP1-3, VP6, NSP2, NSP5 y NSP6) y material genético recién sintetizado. Estudios han propuesto que las proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 contribuyen a la formación, estabilidad y dinámica de dicha inclusión citoplasmática (Eichwald, *et al.*, 2004).

NSP2 es una de las principales proteínas asociadas a la formación de viroplasma en conjunto con NSP5 (Carreño-Torres, *et al.* 2010). Su función ha sido relacionada con la ubicación de dichas inclusiones cerca del perinúcleo y aproximación con el retículo endoplásmico (Eichwald, *et al.* 2004; Carreño-Torres, *et al.* 2010; Eichwald, *et al.* 2012). Asimismo, es una enzima multifuncional con funciones en el empaquetamiento de dsRNA dentro de las DLP que se ensamblan en el viroplasma (Silvestri, *et al.* 2004; Taraporewala Z, *et al.* 2001).

Asimismo, dentro de los viroplasma se efectúa el ensamblaje de nuevas partículas víricas. Sin embargo, debido a que las proteínas VP4 y VP7 migran hacia el retículo endoplásmico apenas son producidos, éstas no forman parte de los viroplasma. Por lo

tanto, las partículas de doble capa formadas deberán llegar a este organelo para la maduración del virus (Estes and Kapikian, 2001; Silvestri *et al.* 2004).

El ciclo de replicación concluye con la liberación de las partículas virales maduras hacia el lumen intestinal lisando a la célula hospedera. Para este mecanismo, se han propuesto la participación de la proteína estructural NSP4 y el desequilibrio iónico que favorece el incremento de calcio intracelular (Arias 2001). Es así como las nuevas partículas virales emergen de la célula hospedera siendo capaces de infectar enterocitos sanos y repetir el ciclo.

Epidemiología

Los rotavirus del grupo A, son responsables de ocasionar desde infecciones asintomáticas hasta diarreas agudas severas (Comité Nacional de Infectología, 2006). Estos casos se presentan principalmente en niños menores de 5 años, aunque se han reportado esporádicamente infecciones en adultos (Organización Panamericana de la Salud, 2010). Su ruta de transmisión es principalmente fecal-oral, puede transmitirse de persona a persona por medio de fómites y al ingerir agua o comida contaminada. Incluso su transmisión se ve favorecida en guarderías, parques y escuelas (Payne, 2011).

Alrededor del mundo, se registran anualmente 111 millones de casos diarreicos; 25 millones son atendidos en centros de salud y 2 millones requieren de hospitalización. Asimismo, cada año se reportan entre 454 mil y 705 mil muertes, representando el 5% de las muertes en los menores (Parashar U.D. *et al.*, 2006; Tate *et al.* 2012).

Rotavirus afecta por igual tanto en países industrializados como en vías de desarrollo. Sin embargo, la incidencia de muertes en países en vías de desarrollo tales como la India, África subsahariana y sureste de Asia son más elevadas (Patton, 2012). En nuestro país, se considera al rotavirus como la principal causa de gastroenteritis aguda,

primordialmente en infantes menores de un año quienes sufren un primer contacto con el agente infeccioso (Velásquez F.R. *et al.*, 2004).

Durante las co-infecciones por rotavirus existe facilidad de intercambio entre sus segmentos génicos durante la infección viral en el enterocito, esto debido a la característica segmentada de su material genético. El factor más importante en la generación de cepas rearrreglantes de rotavirus son las frecuencias de coinfección, en países en vías de desarrollo la frecuencia puede ser tan alta como 20%, en cambio, en países desarrollados la frecuencia se presenta en menos de 5% de los casos (Gray and Iturriza-Gomara, 2011; Organización Mundial de la Salud, 2011).

En estudios enfocados a rotavirus del grupo A, las cepas fueron asignadas como serotipo G y serotipo P basados en la reactividad antigénica de sus epitopes VP4 y VP7. Recientemente se han descrito un sistema binario de nomenclatura viral en base a las variables que presentan los genes (genotipo), se han descrito 27 genotipos G (G1-27) y 35 genotipos P (P[1]-[35]) (Matthijnessens *et al.* 2011).

Entre las combinaciones que se presentan entre ellos, podemos encontrar que la mayoría de los rotavirus humanos asociados a enfermedades diarreicas presentan estas combinaciones genotípicas a nivel mundial: G1P[8], G2P[4], G3P[8] o G9P[8] (Santos y Hoshino, 2005; WHO, 2011). En países desarrollados, cepas de rotavirus humano con combinaciones G/P poco comunes a causa de los rearrreglos génicos, pueden ser una causa frecuente de enfermedades entre la población joven (Armah *et al.* 2010; Binka *et al.* 2011; Organización Mundial de la Salud, 2011).

Métodos de control y tratamiento

Con el fin de controlar el número de incidencias por gastroenteritis viral, se han desarrollado esfuerzos en cuanto a la inmunización de poblaciones susceptibles. Entre el 2004-2008 fueron aprobadas dos vacunas para su administración mundial. Una de ellas

consiste en una vacuna pentavalente que confiere protección contra cinco cepas de rotavirus y otra monovalente la cual confiere protección contra la cepa más representativa (Comité Nacional de Infectología, 2006; Payne C.D. *et al.*, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó en el 2009 la implantación de la vacuna monovalente en todos los sistemas de vacunación. La recomendación fue extendida principalmente hacia aquellos países donde más del 10% del número total de defunciones anuales en infantes sea a causa de rotavirus (WHO, 2009). Debido a esto, sólo la vacuna monovalente se distribuye a nivel mundial. Incluso en algunos países (incluido México) ya se encuentra dentro del esquema básico de vacunación. No obstante, continúan los esfuerzos por asociaciones mundiales de salud para hacer llegar esta vacuna hacia países en vías de desarrollo con altas cifras de morbilidad y mortalidad son muy significativas (Organización Panamericana de la Salud, 2010; Madhi S.A. *et al.*, 2010).

Asimismo, la variabilidad de los rotavirus, el riesgo de los lactantes vacunados a presentar reacciones adversas y los problemas en la accesibilidad a los sistemas de salud; convierten a rotavirus en un problema difícil de controlar y erradicar. Es por esto, que siguen vigentes las evaluaciones acerca de la efectividad y susceptibilidad de las vacunas comerciales (Chandran *et al.* 2010; Tate *et al.* 2012).

Debido a la gran cantidad de líquidos que se pierden durante las evacuaciones constantes en el transcurso de la infección por rotavirus, la deshidratación es la consecuencia más frecuente de esta enfermedad. Por lo tanto, uno de los tratamientos sintomáticos más importantes es la rehidratación de los pacientes infectados. Asimismo, una rehidratación inadecuada puede ser la diferencia entre la vida y la muerte de un paciente con gastroenteritis por rotavirus (Organización Panamericana de la Salud, 2010).

Situación actual: búsqueda de alternativas

La orientación hacia productos naturales obtenidos de plantas parece ser una alternativa atractiva no sólo para el tratamiento de rotavirus, sino también para el tratamiento de enfermedades como la fiebre amarilla, el virus influenza, herpes e incluso el SIDA (Jassim S.A.A. and Naji M.A., 2003; Meneses L.R., 2007; Okatami P.M., 2007).

Existe una considerable proporción de la población mundial que hoy en día prefiere el uso de la medicina natural para el tratamiento o prevención de enfermedades. Incluso, se ha reconocido que alrededor del 50% de los medicamentos actualmente comercializados poseen componentes derivados de plantas (Jaramillo, 2005). Lo anterior ha influenciado a las compañías farmacéuticas para producir nuevas formulaciones antimicrobianas con base en extracciones naturales de plantas.

Considerando que la utilización de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades es una práctica común, la evaluación de extractos de plantas con actividad antiviral es una alternativa para la elaboración de nuevos fármacos efectivos. Se sabe que los recursos naturales de plantas son ilimitados, por lo que la búsqueda de su utilidad fitoquímica es necesaria. Sin embargo, aunque un número significativo de estudios han utilizado purificados químicos de plantas, muy pocos estudios se han basado en el uso de plantas o hierbas en crudo (Jassim S.A.A. and Naji M.A., 2003).

Existen estudios en donde se ha demostrado la capacidad anti-rotavirus de determinados compuestos extraídos de plantas con resultados alentadores, sin embargo, es necesario continuar con sus evaluaciones para obtener resultados concluyentes y el análisis de sus efectos *in vivo* (Takahashi *et al.*, 2001; Andres *et al.*, 2007; Roner *et al.*, 2010; Hyung-Jun *et al.*, 2010; Chingwaru *et al.*, 2011).

***W. americana* L.**

El género *Waltheria* comprende alrededor de 60 especies (Saunders, 2011). *W. indica* fue reportada en 1753 por Linnaeus. En 1975, se reportaron las especies *W. indica* y *W. americana* de forma simultánea. Debido a las características muy similares de ambos reportes, Robert Brown propuso la combinación de ambas bajo el nombre *W. indica* var. *americana* (Fosberg y Sachet, 1975). Asimismo, se propuso utilizar el nombre var. *americana* cuando la planta presente vellosidades densas y la var. *indica* como una especie poco pubescente.

Proviene de la familia Malvaceae, sin embargo, se ha sugerido que *W. indica* sea incluido dentro de la familia Sterculiaceae. En recientes investigaciones, se han utilizado los dos nombres latinos: *W. indica* y *W. americana* cuyas variaciones se deben a la región donde los especímenes fueron colectados (Zongo *et al.*, 2013).

Dicha planta crece sobre áreas como pastizales, entre maleza en carreteras, cultivos de algodón, en suelos áridos o agrietados (Saunders, 2007). Su crecimiento puede ser perene en hábitats constantemente húmedos. Es un arbusto de vida corta que alcanza alturas de 2 metros y un tallo angosto con un diámetro promedio de 2cm. Presenta una sola raíz principal flexible de color café. Las hojas son densamente pubescentes y presentan de 4 a 5 nervaduras profundas en el limbo (figura 1). La planta florece después de 6 meses del crecimiento y su floración es más o menos continua hasta su muerte. El glomérulo contiene flores amarillas o naranjas y su propagación es a través de semillas (Saunders, 2011; Kerharo y Adam, 1974).

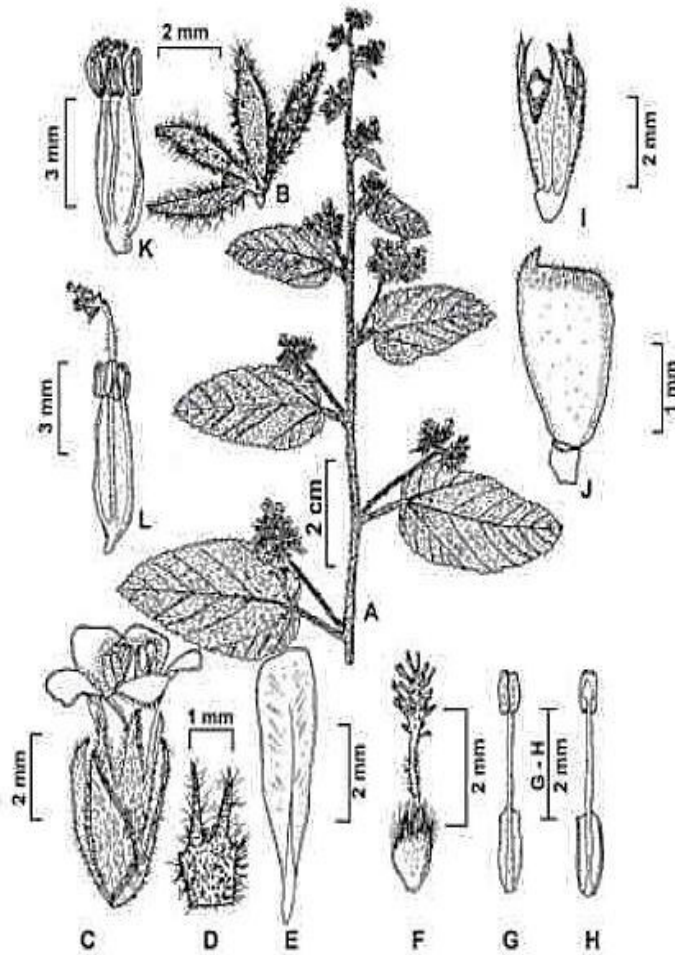


Figura 1. *W. indica* L: A. Rama con flor y fruto. B. Brácteas, vista frontal. C. Flor brevistila. D. Detalle del cáliz, cara abaxial. E. Pétalo, cara adaxial. F. Gineceo. G, H. Estambres, cara abaxial y adaxial. I. Cáliz cubriendo el fruto. J. Fruto. K. Detalle flor mediostila. L. Detalle flor longistila (Baudilio, 2008).

Se han reportado diversos tipos de extracciones, ya sea de alguna parte o de la planta completa. Entre ellas se mencionan la decocción, infusión y maceración, siendo la decocción la más ampliamente utilizada (Zongo, 2013). Los constituyentes químicos que se pueden obtener de estas extracciones se encuentran los alcaloides, flavonoides (epicatequina, tilirosido, quercetina, kaempferol), esteroides, terpenos, glicósidos cardiacos, saponinas, antraquinonas y carbohidratos (Loustalot y Pagan 1949). Asimismo, estudios han revelado que la mayoría de estos compuestos se obtiene principalmente de extracciones utilizando la planta completa (Zongo, 2013).

Entre los primeros reportes en África se encontró que *W. americana* posee propiedades abortíferas. Por lo que fue una hierba utilizada para la regulación de la fertilidad en mujeres de varias tribus y grupos étnicos (Kumar *et al.*, 2012). Ciertas plantas

pertenecientes a la familia Sterculiaceae, entre ellas *W. americana*, han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades orales en Burkina Faso. Existen registros en donde se indica que las raíces de esta planta son utilizadas para el tratamiento de dolores dentales y para el tratamiento de la gingivitis (Tapsoba *et al.*, 2006).

Un estudio realizado en Panamá demostró que *W. indica* posee actividad inhibitoria de la proteasa de HIV, una enzima esencial durante el ciclo replicativo. Extractos acuosos de las ramas mostraron capacidad de inhibir en un 50% su capacidad enzimática (Matsuse *et al.*, 1999). Un estudio realizado en el sur de África, indicó que extracciones metanólicas de *W. indica* son un buen recurso como drogas anti-malaria (Clarkson *et al.*, 2004).

Entre los usos de hierbas medicinales en México, se han reportado a *W. americana* para el tratamiento de enfermedades cancerígenas. Reportándose en Baja California Sur la utilización de hojas, tallos y raíces de la planta para dichos propósitos (Dimayuga *et al.*, 1987). Un reporte demostró que *W. indica* posee actividad antidiabética y antioxidante, sugiriendo su uso en el tratamiento de diabetes mellitus. Shai y colaboradores reportaron que dicha planta tiene una actividad inhibitoria del 60% para la enzima α -glucosidasa y posee buena actividad antioxidante (Shai *et al.*, 2010).

En el distrito de Bunda en Tanzania, extracciones de diversas plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades infecciosas fueron evaluadas contra bacterias, virus y hongos. Resultados demostraron que extracciones con n-Hexano de los rebrotes de *W. americana* poseen actividad antibacteriana pero no demostró actividad contra los virus del Herpes Simplex tipo 1, Virus T2, virus Coxsackie B2 y Semiliki Forest A7 (Maregesi *et al.*, 2008).

Entre las zonas donde se emplea dicha planta como auxiliar en el tratamiento de diarrea se encuentran Nigeria, Burkina Faso, México y Panamá (Zailani, *et al.*, 2010; Kerharo y Bouquet, 1950; Rojas, *et al.*, 2010; Leonard, 2010). Un estudio etno-farmacológico en el

sur de África, mencionó que *W. indica* es utilizada comúnmente para el tratamiento de la diarrea al combinarse con otras hierbas terapéuticas (Mathabe *et al.*, 2006). En esta misma región, se indicó que extracciones metanólicas de la raíz de *W. indica* posee grandes propiedades inhibitorias. Los resultados mostraron que lograron la inhibición de bacterias como *Salmonella spp*, *staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris* validando el uso etno-farmacológico de esta planta (Mongalo *et al.*, 2013).

Se ha evaluado en México, la actividad de *W. americana* frente a la diarrea inducida en ratones al administrar aceite de castor o sulfato de magnesio. Sin embargo, las extracciones con hexano, cloroformo, metanol y agua no fueron capaces de reducir la diarrea en el modelo farmacológico utilizado (Zavala *et al.*, 1998). En Tanzania, un reporte dio a conocer las plantas utilizadas por la población para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se reconoció que *W. americana* es utilizada para el tratamiento de diarrea con sangre, sífilis y convulsiones (Maregesi *et al.*, 2007).

La presencia de las malezas en cultivos agrícolas es de importancia debido a que pueden competir por requerimientos de agua, nutrientes e incluso luz solar. La presencia de *W. americana* en cultivos cítricos fue evaluada en Nuevo León en el 2009. Se encontró que en meses cálidos como marzo y abril aumenta la densidad de población de dicha maleza. Siendo una de las hierbas más comúnmente encontradas en cultivo de naranja valencia (Rocha-Peña *et al.*, 2009).

En el 2007, se realizó una investigación en el estado de Oaxaca con el fin de describir y conocer los usos de las hierbas florales que comúnmente crecen alrededor de los cultivos agrícolas. Se encontró que más del 90% de las hierbas reportadas poseen uno o más usos según el conocimiento de los granjeros. Se observó que *W. americana* representa más del 60% de las hierbas que crecen en cultivos de cítricos. Además de reportar su uso como forraje y medicinal principalmente (Blanckaert *et al.*, 2007).

Estudios acerca de la toxicidad de *W. indica* sugieren que dicha planta debe ser usada con precaución. Se han empleado extracciones acuosas e hidro-etanólicas de dicha planta para medir su grado de toxicidad en ratones administrándose ya sea vía oral o intra peritoneal. Las concentraciones que mostraron una dosis letal media (DL₅₀) se encuentran entre 100 y 800 mg/kg (Dhar, *et al.* 1973; Mohammed, *et al.* 2007; Hamidu *et al.* 2008).

Un estudio de citotoxicidad por medio del ensayo MTT utilizando flavonoides extraídos de *W. indica* no mostraron toxicidad a concentraciones de 2.5 a 100 µM (Rao *et al.*, 2005). Hasta ahora, no existen datos suficientes sobre la toxicidad específica de los compuestos fotoquímicos presentes en dicha planta. Así como los efectos secundarios en humanos, sin embargo se advierte su uso durante el embarazo (Leonard, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que aún no se cuenta con un tratamiento específico para la gastroenteritis por rotavirus, la obtención de alternativas efectivas contra rotavirus continúa siendo necesaria. Especialmente en pacientes inmuno-comprometidos e infantes alrededor del mundo. Como se ha mencionado anteriormente, aunque las propiedades y usos de *Waltheria* son numerosos, su información acerca de sus propiedades antivirales es escasa. Por tal motivo, fue de interés el estudiar extracciones acuosas e hidro-etanólicas de *W. americana* frente a la infección por rotavirus humano. Así como tener una mejor visión de los posibles mecanismos que puedan estar involucrados en esta actividad antiviral.

HIPÓTESIS

Los extractos acuosos e hidro-etanólicos de *W. americana* poseen actividad antiviral durante el ciclo de replicación de rotavirus.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el efecto antiviral de *W. americana* durante el proceso de replicación de rotavirus humano en células MA 104.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto antiviral de los extractos acuosos e hidro-etanólicos sobre la interacción virus-anticuerpo en la etapa pre-infección de rotavirus Wa y DS-1.
2. Determinar la actividad de los extractos durante la entrada y replicación viral; analizando eventos como la síntesis de genoma viral y producción de proteínas.

METODOLOGÍA

Cultivo celular

Se realizó un sub-cultivo rutinario para mantener la línea celular en condiciones óptimas requeridas para este estudio. A partir de un cultivo con células MA 104 confluentes, en un frasco de 25 cm² (aproximadamente 5x10⁶ células) fueron lavadas con buffer EDTA 0.68 mM. La monocapa celular se disgregó con 500 µl de tripsina-EDTA 0.25% efectuando movimientos suaves hasta que las células adheridas sean desprendidas de la superficie del frasco.

La reacción enzimática fue detenida agregando 2.5 ml de D-MEM suplementado con SFB 3% y L-Glutamina homogenizando lo suficiente para obtener la mayor cantidad de células individuales (Freshney, 2010). Una vez homogenizada la suspensión celular, se tomaron 300 µl y se inocularon en un frasco de cultivo de 25 cm² estéril con 4.5 ml de medio D-MEM suplementado con Suero Fetal Bovino 3% y L-Glutamina. Las células transferidas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ alrededor de 96 horas.

Propagación de las cepas DS-1 y Wa en células MA 104

Alícuotas de 300 a 500 µl de un stock viral (Wa o DS-1) fueron activados agregando 1 µl de Tripsina 1% e incubando a 37°C con 5% de CO₂ durante 30 minutos (Arias, 2001). Posteriormente, las células se lavaron por duplicado con PBS-A 1X y se agregó el stock viral previamente activado. Se permitió el reconocimiento entre receptores virales y celulares incubando la mezcla en condiciones antes mencionadas por un periodo de una hora. A continuación, se lavó nuevamente con PBS A 1x retirando el exceso de virus no adheridos.

Se reemplazó con medio MEM suplementado con L-Glutamina y HEPES. Las células fueron incubadas en un periodo de 24 - 48 horas o bien, hasta observarse el efecto citopático característico. Al presentarse igual o mayor al 50% de desprendimiento en la monocapa, las células fueron cosechadas mediante tres ciclos de congelación-descongelación liberando así la mayoría de los viriones producidos. Se realizaron alícuotas en tubos de micro centrífuga de 0.5 ml, identificados y almacenados a -20°C hasta su uso.

Microtitulación de focos infecciosos

Esta técnica de titulación viral se basó en lo descrito por Arias en 1986, con ciertas modificaciones. Las alícuotas virales fueron pre-activados con 1 µl de Tripsina 1% y diluidos en medio MEM sin suero utilizando una placa de 96 pozos estéril para obtener diluciones seriadas de 1:2 a 1:128. Células MA 104 confluentes sembradas en una placa de 96 pozos se lavaron con 200 µl de PBS A 1X por pozo. Se agregaron sobre las células pre-lavadas 50 µl del lisado viral concentrado y posteriormente 50 µl de las diluciones virales correspondientes en cada pozo. Dichas diluciones se realizaron por duplicado para cada alícuota a titular.

La placa se mantuvo en incubación a 37°C con 5% de CO₂ durante una hora. Posteriormente, el exceso de virus no adheridos se removieron lavando una sola vez con de PBS A 1X. Se agregó 150 µl de MEM sin suero a cada pozo y se permitió el curso de la infección incubando la placa durante 14 horas. Una vez cumplido el periodo de incubación, el medio de cultivo fue retirado y se realizó el proceso de tinción de focos como se describe a continuación.

Las células infectadas, se fijaron con 100 µl de Acetona 80% - PBS A 5X, y se incubó a temperatura ambiente durante 40 minutos. Después de dos lavados con PBS A 1X, las células fijadas se incubaron una hora a 37°C con 75 µl de anticuerpo Anti-rotavirus Wa producido en conejo diluido 1:700 en PBS A 1X. Una vez cumplido el periodo de

incubación se retiró el anticuerpo y se lavaron las células con PBS A 1X. Posteriormente, se adicionó 75 µl de proteína A - peroxidasa de rábano (Invitrogen) diluida 1:1000 en PBS A 1X a cada pozo y se mantuvo una hora a 37°C.

Después de un lavado con PBS A 1X, se agregó el Carbazole el cual es sustrato para la peroxidasa. Dicho sustrato se preparó mezclando 8.5 ml de Buffer de Acetatos 0.05 M pH 5, 10 µl de peróxido de hidrógeno 30% y 1.5 ml de Carbazole (Sigma-Aldrich). Una vez preparado el sustrato se filtró utilizando un filtro Milipore de 0.45 µm para clarificar la solución. Posteriormente, se añadieron 75 µl a cada pocillo y se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a 37°C. Dicha reacción se detuvo añadiendo agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Cuenta de focos infecciosos

Después de realizar el proceso de titulación viral las células teñidas se contabilizaron utilizando un microscopio invertido con el objetivo de 20X. Los focos infecciosos fueron diferenciados debido a que se tiñen de rojo intenso en contraste con las células no infectadas, se consideró solamente un diámetro de campo visual para contabilizar.

Posteriormente se registró el conteo de todos los virus titulados con sus repeticiones, se calcularon los promedios y determinó el título de focos infecciosos en la última dilución del lisado donde sean contabilizados entre 100 y 200 focos infecciosos. Una vez obtenido el título viral se determinaron las UFF/ml (Unidades Formadoras de Focos por mililitro) el cual se calculan de la siguiente manera:

$$UFF/ml = 20(5.5)(\text{Promedio de focos})(\text{Dilución})$$

Donde:

20 = Objetivo 20X del microscopio invertido

5.5= Diámetro (mm) del pozo de la micro placa de 96 pozos

Promedio= promedio del número de focos en la dilución

Dilución= Dilución donde se contó de 100-200 focos infecciosos

Multiplicidad de infección

Se refiere a la cantidad de virus inoculado por célula del cultivo celular. La multiplicidad de infección (MI) fue utilizada para estandarizar la cantidad de virus a utilizar en las infecciones celulares posteriores, la dosis infecciosa óptima fue calculada de la siguiente manera:

$$MI = (UFF/ml) / (\# \text{ células})$$

NOTA: El número de células dependerá del área de cultivo que se va infectar e indica la cantidad teórica de células totales presentes en la monocapa.

Obtención de extractos acuosos

Hojas, ramas y tallos de *W. americana* fueron adquiridas desecadas en establecimientos comerciales de la región. Serán utilizadas de 100 a 200 gr de tallos y hojas para desinfectarlas en Cloro 1% durante cinco minutos.

El proceso de extracción se basó en lo descrito por Montanha *et al.* (2004) con ciertas modificaciones. Una vez desinfectadas, fueron depositadas en 500 ml de agua bidestilada en un vaso de precipitado y permanecieron a 100°C durante cinco minutos. Posteriormente se utilizó un filtro Whatman grado 2 para retirar las partículas de gran

tamaño, el producto de la filtración se sometió a 40 °C 48 a 72 horas para evaporar el agua y recolectar el extracto en polvo.

Se determinó el peso del producto final obtenido y se realizaron los cálculos pertinentes para ajustar los extractos a nuestra concentración de trabajo (100 mg/ml). El extracto disuelto en agua bidestilada, se centrifugó a 14,000 rpm por uno a dos minutos para eliminar partículas suspendidas de gran tamaño. Nuevamente fue filtrada en condiciones estériles con un filtro Millipore de 0.45 µl y 0.22 µl. Por último, los extractos serán etiquetados y almacenados a 4°C hasta su uso.

Obtención de extractos hidro-etanólicos

A partir de una solución de 500 ml agua-etanol (1:1) en un vaso de precipitado se agregaron 100 a 200 gr de hojas y tallos previamente desinfectados. Posteriormente se incubó por 24 horas a 37°C en oscuridad. Posteriormente, se filtró con Whatman #2 para retirar las partículas de gran tamaño y el producto de filtración fue desecado por temperatura. Al obtener el extracto en polvo, se resuspendió en agua bidestilada realizando los cálculos pertinentes para establecer las concentraciones de trabajo.

Al igual que los extractos acuosos, el extracto disuelto fue centrifugado a velocidad máxima de uno a dos minutos para eliminar partículas suspendidas de gran tamaño. Se filtró en condiciones estériles con un filtro Millipore de 0.45 µl y 0.22 µl para asegurar su esterilidad. Por último, los extractos se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Evaluación de citotoxicidad con extractos acuosos e hidro-etanólicos

Para evaluar la toxicidad de los extractos sobre células MA 104, se realizaron diluciones de cada extracto (acuoso e hidro-etanólico) en medio de cultivo D-MEM suplementado con SFB 3% y L-Glutamina. Las diluciones comprendieron desde 1:2 (50 mg/ml) hasta 1:4096 (0.024 mg/ml).

Se utilizó una placa de 96 pozos sembrado con células MA 104 (aproximadamente 4×10^4 células por pozo). Posteriormente una vez que se permitió la adherencia celular, el medio de cultivo se extrajo y se depositaron 100 μ l de cada dilución de extracto. Se incubaron las células de 24 - 48 hrs a 37 °C y 5.0% CO₂. La citotoxicidad fue determinada por el examen microscópico de la morfología celular en cultivos tratados y no tratados.

Aquella concentración de extracto en el que el efecto citopático se observe un 50% de la monocapa con respecto a los controles, se considerará como la concentración citotóxica 50% (CC50). Asimismo, la concentración máxima a la que no se observe efecto citopático (en comparación con los controles) se consideró como la concentración máxima de tolerancia (CMT). Dicha concentración fue sugerida para cada extracto antes de realizar los ensayos de actividad antiviral. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado (Montanha *et al.*, 2004).

Evaluación del potencial antiviral de los extractos

Con el objetivo de evaluar la efectividad antiviral de cada extracto sobre la infección de rotavirus humano en cultivo celular, los ensayos de actividad antiviral fueron realizados en dos eventos. Extractos no citotóxicos fueron aplicados sobre los virus durante una hora antes de la infección (figura 2b) y sobre las células una hora después de la infección (figura 2c). El porcentaje de inhibición viral se determinó en base al número de unidades formadoras de focos infecciosos (UFF) obtenidos en una infección en ausencia de extracto (figura 2a). Las concentraciones efectivas fueron aquellas que alcanzaron una disminución de focos mayor al 60% respecto a los controles.

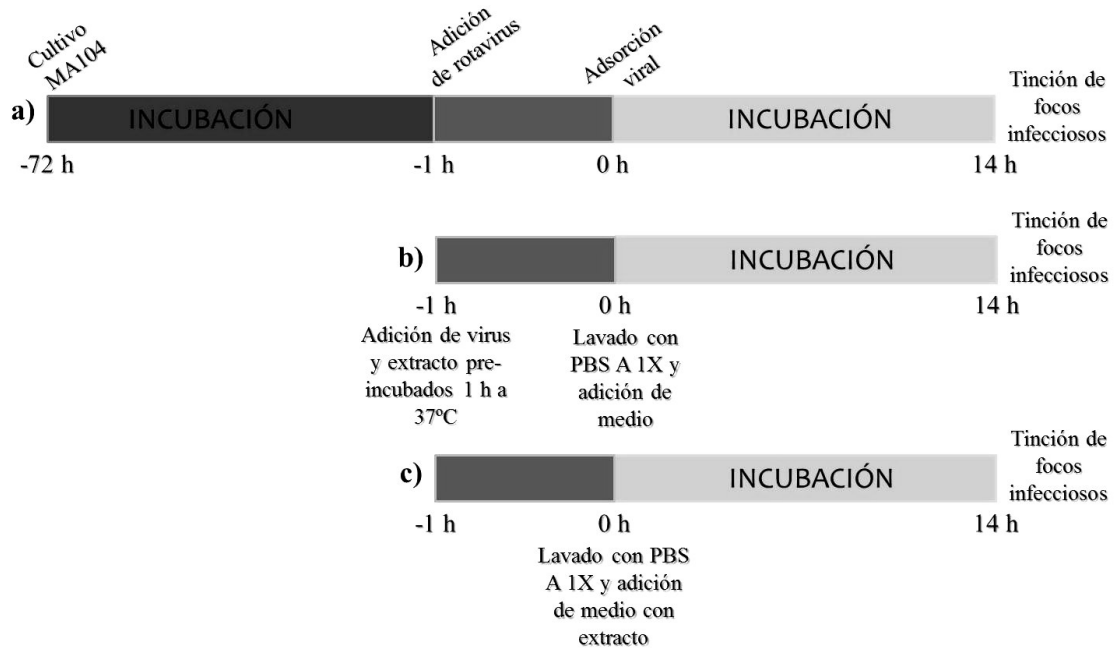


Figura 2. Línea de incubación en la infección de células MA 104 con rotavirus humano. a) Curso de infección habitual para realizar la tinción de focos infecciosos, b) Infección de células MA 104 con cepas de rotavirus humano pre-tratado con extractos, c) Adición de extracto posterior a la infección de células MA 104 con rotavirus humano.

Efecto de los extractos sobre la partícula infectiva de rotavirus

Lisados con rotavirus Wa y DS-1 se incubaron durante 1 hora a 37°C en presencia de las diluciones no citotóxicas de los extractos acuosos e hidro-etanólicos. Posteriormente se utilizó una placa de ELISA para ser sensibilizada con dicha mezcla (virus pre tratado), asimismo se sensibilizaron pocillos con lisados virales no pre tratados y diluciones de extractos por separado como controles positivos y negativos, así como también se utilizó un MOCK celular como blanco. La placa se incubó a 4°C durante toda la noche.

Una vez sensibilizada la placa de ELISA, se lavó 5 veces con PBS A 1x – Tween 0.1% y enseguida se bloqueó utilizando buffer PBS A 1x – Leche descremada 5%. Se incubó a 37°C por una hora y media. Posteriormente, se realizaron 5 adicionales y se añadieron los anticuerpos de detección dirigidos contra la partícula completa de rotavirus (anti-Wa producido en conejo), diluidos previamente en PBS A 1x – Tween 0.1% con diluciones

de 1:400 y 1:1600 para las cepas DS-1 y Wa respectivamente. A continuación, se incubó la placa a 37°C durante una hora.

Después de cuatro lavados se añadió el conjugado Proteína A unida a peroxidasa de rábano (Invitrogen) diluida 1:2500 en PBS A 1x – Tween 0.1% e incubándose durante una hora a 37°C. Posteriormente se lavó la placa y se agregó 50 µl del sustrato ABTS (KPL) para la peroxidasa de rábano y se incubó 30 minutos a 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción colorimétrica añadiendo 50 µl de SDS 1% a cada pozo, y se tomó la absorbancia en un lector de ELISA (Digital and Analog Systems S.R.L. modelo A2) a 405 nm. Se consideró una reactividad positiva cuando las absorbancias de los pozos con virus pre tratado sean tres veces mayores con respecto al MOCK (control negativo). Asimismo fue comparada con la absorbancia de reactividad positiva que produjeron los virus no pre tratados, los cuales fueron considerados controles positivos.

Análisis de RNA genómico

Se infectaron células MA 104 con lisados de rotavirus Wa o DS-1 (MI 0.1) pre-activados con 1 µl de Tripsina 1% en una placa de 6 pozos. Concentraciones no citotóxicas de extractos acuosos o hidro-etanólicos se agregaron antes o después de la infección mencionada. Posteriormente, se detuvo el proceso infectivo a diferentes tiempos de incubación (4, 8, 16, 24 horas).

Las células fueron desprendidas de los pozos mecánicamente por raspado, se colectaron en un tubo de micro centrífuga de 0.5 ml. Se realizó la extracción de RNA total por el método de TRI REAGENT (Trizol) de acuerdo a las condiciones del fabricante. Posteriormente, se realizó un análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 8% y una tinción con Nitrato de Plata 1X.

Posteriormente, los resultados se analizaron con respecto a los controles, los cuales fueron lisados obtenidos en ausencia de extracto así como el un control negativo (células sin infectar). A partir de este análisis se determinó la presencia o ausencia de patrón electroforético de cada muestra sobre el gel de poliacrilamida.

Efecto anti-rotavirus en la producción de proteínas virales

Se infectaron células MA 104 (aproximadamente 2×10^6) con rotavirus Wa o DS-1 (MI 0.1) pre-activados con 1 μ l de Tripsina 1% en una placa de 6 pozos. Concentraciones no citotóxicas de extractos acuosos o hidro-etanólicos fueron agregados antes o después de la infección mencionada. Posteriormente, se detuvo el proceso infectivo a diferentes tiempos de incubación (4, 8, 16, 24 horas). Las células fueron desprendidas de los pozos mecánicamente por raspado y se colectaron en un tubo de micro centrífuga de 0.5 ml. Posteriormente se agregó 30 μ l de buffer Laemmli y se mantuvieron los tubos a 95°C en baño maría durante 5 minutos.

Dichas muestras serán cargadas en un gel de corrimiento en condiciones desnaturalizantes utilizando el gel de poliacrilamida discontinuo (gel stacking 4% y gel running 12%). Una vez armado el sistema de electroforesis con buffer SDS-Tris-Glicina 1X, se corrió a 15 mA constantes aproximadamente de 40 a 50 minutos. Se utilizó a continuación una cámara de transferencia de proteínas y se ensambló el sistema para transferir el corrimiento anterior en una membrana de nitrocelulosa. El corrimiento del sistema se realizó utilizando buffer de transferencia, y se mantuvo a 60 Volts durante una hora con agitación constante.

Posteriormente el gel discontinuo de poliacrilamida fue teñido con azul de Coomassie durante toda la noche, para observar el perfil proteico total de los lisados utilizados. Asimismo, el gel de nitrocelulosa fue lavado por triplicado con buffer TBS pH 7.5 y después se sumergió en solución bloqueadora (buffer TBS-Tween 2%) durante 40 minutos en agitación constante.

Se retiró la solución bloqueadora realizando tres lavados con buffer TBS-Tween 0.05% en agitación constante. Posteriormente, se agregaron los anticuerpos de detección para la proteína estructural VP4 (anticuerpo dirigido contra la subunidad VP8* de rotavirus Wa producido en conejo), anti-NSP2 o un anticuerpo anti-DS-1. Se permitió el reconocimiento antígeno-anticuerpo en la membrana de nitrocelulosa almacenando a 4°C toda la noche. A continuación, se realizaron tres lavados con buffer TBS-Tween 0.05% y se agregó el conjugado anti-IgG producido en conejo unido a fosfatasa alcalina (PROMEGA) dilución 1:7500. Se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación de 100 rpm.

Después de lavar por triplicado, se agregaron 4 ml de sustrato (PROMEGA) y se dejó reaccionar con agitación gentil durante tres minutos. Por último, se detuvo la reacción lavando tres veces con agua bidestilada. La membrana se dejó secar y se analizó con el resultado del corrimiento en el gel de poliacrilamida-SDS 12% una vez que el gel sea decolorado con una solución de metanol-ácido acético 2%. Los resultados en presencia de extracto fueron comparados con lisados en ausencia de extracto y se determinó la presencia o ausencia de bandas reactivas en cada una de las muestras.

Obtención de proteínas NSP2 recombinantes

A partir de RNA genómico extraído de lisados de rotavirus humano (Wa y DS-1), se realizó una reacción de RT-PCR (tabla 1) para amplificar el fragmento correspondiente a la región codificante del gen 8 de rotavirus. Para dicho propósito, se diseñaron oligonucleótidos NSP2_25/43: (5'-CACGGATCCTTTGAGCCTTGCGGTGTA-3') y NSP2_1042/1049: (5'-CACGTCGACGGTCACATAAGCGCTTTC-3') a partir de análisis de secuencias obtenidas de GenBank. Dichos oligos poseen sitios de restricción BamHI y SalI respectivamente, necesarios para efectos de clonación.

Tabla 1. Programación de temperaturas para RT-PCR del gen 8 de rotavirus. Para dichas reacciones se utilizó un termociclador de gradientes (PTC-200, MJ Research®)

<i>Amplificación gen 8 de rotavirus: Programación de ciclos</i>	
RT-RV8	95°C (5 min), 42°C (1 h), 94°C (5 min)
PCR-RV8	94°C (90 seg); [95°C (45 seg), 49°C (30 seg), 72°C (90 seg)] 30ciclos; 72°C (15 min)

Una vez amplificado el gen que codifica para la proteína NSP2, se realizó una construcción en el plásmido de clonación pGEM-T (PROMEGA) utilizando el kit de ligación DNA Ligasa T4 3U/μl (PROMEGA). La reacción se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, el plásmido construido con el fragmento de interés fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* DH5α competentes mediante choque térmico. Las bacterias transformadas se sembraron en placas con agar LB/Ampicilina (50 μg/ml), ya que el plásmido de clonación posee un gen de resistencia a dicho antibiótico.

Las clonas resultantes fueron sembradas en 3 ml de caldo LB/Ampicilina (50 μg/ml), y se incubaron a 37°C/270 rpm toda la noche. Se realizó a continuación una purificación de plásmidos a partir de los cultivos sembrados, utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA). Posteriormente, para asegurar que los plásmidos obtenidos poseen el inserto de 1042 pb, se realizó una reacción de restricción doble utilizando las enzimas BamHI (PROMEGA) y SalI (PROMEGA) simultáneamente.

Para visualizar la liberación de inserto, las reacciones de restricción se cargaron en un gel de agarosa 1% y se corrió una electroforesis con buffer TAE 1X durante 1 hora a 100 V constantes. Una vez obtenidos los plásmidos purificados y construidos con el fragmento de interés, se cuantificaron para ajustarse a una concentración de 750 ng/μl en agua miliQ. Dicha concentración fue requerida para la secuenciación del gen clonado, lo cual fue Realizado por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.

Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos de las cepas Wa y DS-1 clonados, se realizó un análisis de secuencias utilizando el software BLAST nucleotide (NCBI) para comprobar que dichas secuencias realmente representen al gen 8 (NSP2) de rotavirus humano. Asimismo, se realizó una comparación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos obtenidos con las secuencias reportadas en la red, utilizando el programa CLUSTAL W/BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.

Posteriormente, se realizó una construcción en el plásmido de expresión pET-28a(+) (NOVAGEN) con los fragmentos analizados correspondientes al gen 8 de rotavirus Wa y DS-1. Para dicho propósito una reacción de restricción fue realizada para el plásmido ya que es un plásmido cerrado. Utilizando las enzimas BamHI y Sall de forma simultánea se crearon extremos adhesivos en el plásmido de expresión y en el fragmento a insertar. Tanto el gen de interés como el plásmido de expresión previamente digeridos, fueron purificados mediante el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). De igual manera, se realizó una reacción de ligación con la enzima Ligasa T4 3U/ μ l (PROMEGA) incubando a 4°C toda la noche.

Para comprobar la que la construcción del plásmido pET-28a(+) con el gen 8 fue realizado, se realizó una PCR utilizando oligonucleótidos que delimitan al sitio múltiple de clonación del plásmido. Los cebadores pET-28F (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') y pET-28R (5'-ATGCGTCCGGCGTAGA-3') son capaces de amplificar un fragmento de 362 nt correspondiente al sitio múltiple de clonación. Por lo tanto, al realizar la PCR, se obtuvo un amplicón de 1404 nt lo que indica que se incluye al inserto de interés de 1042 nt.

Bacterias *E. coli* DH5 α competentes fueron transformadas con el plásmido pET-28a(+)/gen 8 de rotavirus, por medio de choque térmico. Posteriormente fueron sembradas en placas de agar LB/Kanamicina (50 μ g/ml) A 37°C durante 12 horas en agitación constante. Una vez obtenidas las clonas, se realizó una purificación de

plásmidos y un análisis con enzimas de restricción para comprobar la presencia del inserto.

Bacterias *E.coli* BL21 (DE3) competentes fueron transformadas con pET-28a(+)/gen 8 de rotavirus. Una vez comprobada la presencia de los plásmidos de interés en dichas bacterias, se indujo la expresión de la proteína NSP2 recombinante. Se inocularon las bacterias transformadas en 3 ml de caldo LB/Kanamicina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche en agitación constante. Posteriormente, se tomaron 1.2 ml de dicho cultivo para inocular un matraz con 120ml de caldo LB sin antibiótico (dilución 1:100). El cultivo fue incubado a 37°C/250 rpm durante 2 horas, a continuación se tomó la absorbancia a 590 nm. La incubación fue extendida hasta que la densidad óptica del cultivo oscilara entre 0.4-0.6 de absorbancia.

Un control de bacterias transformadas no inducidas fue considerado al tomar 10 ml del cultivo ajustado y almacenando a 4°C. El resto del cultivo fue inducido adicionando IPTG (1 Mm) e incubando nuevamente a 37°C/250 rpm durante 5 horas. Bacterias inducidas y no inducidas fueron centrifugadas a 5000 rpm/4°C durante 10 minutos. Posteriormente el medio de cultivo fue decantado y el pellet de bacterias se resuspendió en 10 ml/g de buffer binding (Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM). Las bacterias resuspendidas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Debido a que las bacterias competentes no son capaces de expulsar las proteínas recombinantes expresadas, fue necesario realizar una lisis bacteriana para liberar las proteínas producidas. El protocolo de lisis bacteriana fue realizado en dos etapas, primero se agregó lisozima de clara de huevo (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.2 mg/ml y se agitó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron alícuotas de 1 ml para lisar las bacterias con un sonicador por 15 minutos.

Se agregó urea en una concentración final de 8 M, para disolver los cuerpos de inclusión posiblemente formados durante la alta producción de proteínas recombinantes. Por último, los extractos bacterianos se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para comprobar la presencia e integridad de las proteínas obtenidas, extractos de bacterias inducidas y no inducidas se analizaron mediante electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida (gel stacking 4% y gel running 12%) en condiciones desnaturalizantes. Una vez armado el sistema de electroforesis con buffer SDS-Tris-Glicina 1X, se corrió a 15 mA constantes aproximadamente de 40 a 50 minutos. El gel fue teñido con azul de Coomassie toda la noche y posteriormente decolorado con Metanol 10%-Ácido acético 10%.

Las proteínas obtenidas poseen seis histidinas en tándem en el extremo N- terminal, debido a esto, se utilizaron columnas de afinidad His-Trap FF Crude (GE Healthcare) para su purificación por cromatografía de afinidad. La cromatografía fue realizada en condiciones desnaturalizantes en presencia de urea 4M. Se lavó una columna de afinidad nueva con 20 ml de agua bidestilada para eliminar la solución de almacenaje (etanol 20%). Después se equilibró la columna añadiendo 10 ml de buffer binding pH 7.4 (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, urea 4 M).

Posteriormente, se hizo pasar todo el extracto de bacterias lisadas previamente ajustado a pH 7.4. El eluente fue recolectado para futuras purificaciones. Para eliminar el exceso de proteínas bacterianas no afines a la columna se añadió 15 ml de buffer binding (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 100 mM, urea 4 M) en la columna de afinidad. Para recuperar las proteínas retenidas en la columna, se agregaron 5 ml de buffer de elución (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 300 mM, urea 4 M). Las proteínas se recuperaron en alícuotas de 1 ml y se les consideró como fracciones. Para equilibrar la columna de afinidad, se añadieron 10 ml de buffer binding (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 100 mM, urea 4 M) y se almacenaron a 4°C.

Una vez purificada la proteína de interés, se estimó la concentración de cada fracción obtenida mediante una escala comparativa de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (100, 150, 200, 250 y 300 $\mu\text{g/ml}$). Dichas diluciones de albúmina fueron analizadas mediante SDS-PAGE 12% y el corrimiento fue comparado con las proteínas recombinantes obtenidas.

Producción de anti-NSP2 en conejo: esquema de inmunización

Se utilizaron conejos de Nueva Zelanda (machos y hembras) para la producción de los sueros anti-NSP2. Se realizaron 3 inoculaciones vía intradérmica en 6 puntos diferentes sobre el lomo de los conejos, con un intervalo de 15 días entre cada inoculación. El inóculo fue de 1 ml, lo cual correspondió a 0.5 ml de adyuvante de Freud (completo o incompleto) y 0.5 ml de proteína recombinante. Ensayos de ELISA fueron realizados para analizar la reactividad de los sueros de conejo obtenidos del día 0, 15 y 30 posteriores al primer reto con la proteína NSP2 recombinante. Las diluciones de sueros que presentaron las mayores absorbancias fueron considerados para los ensayos de Western blot como se explicó anteriormente.

RESULTADOS

Cultivo celular

Células embrionarias MA 104 (riñón de mono verde africano) fueron cultivadas *in vitro* durante todos los ensayos de este proyecto. Dichos cultivos fueron requeridos para los ensayos de citotoxicidad, propagación viral y actividad antiviral de extractos. Se utilizaron viales de 5 cm², 25 cm², 72 cm², placas de 6 y 96 pozos.

Todos los cultivos fueron incubados en un periodo de 72-96 horas a 36.8-37 °C y una atmósfera húmeda con 5.5% de CO₂ (figura 3). Asimismo, se realizaron múltiples sub-cultivos celulares utilizando D-MEM suplementado con Suero Fetal de Bovino al 3% para obtener células sanas capaces de crecer en las condiciones establecidas para este trabajo. Durante los sub-cultivos no fue necesaria la administración de antibióticos o anti fúngicos al medio para evitar alguna alteración sobre las células. Por lo tanto, el desarrollo y morfología de los cultivos fue constantemente monitoreado por microscopía.

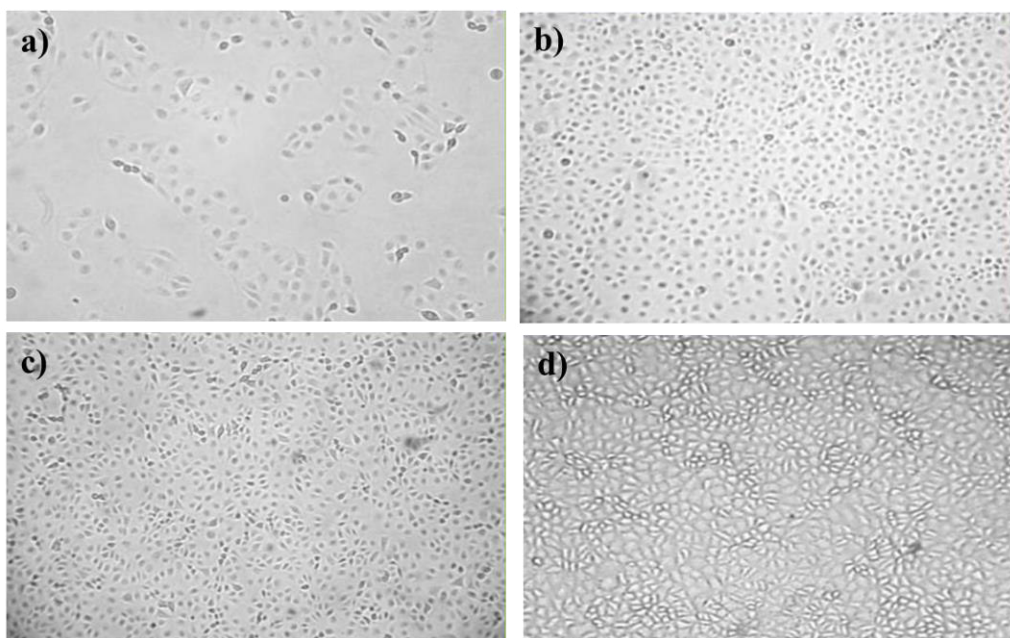


Figura 3. Desarrollo de un cultivo celular en vial de 25 cm² observadas a través de un microscopio invertido (20x). Células MA 104 incubadas 24, 48, 72 y 96 horas post-incubación (incisos a, b, c, y d, respectivamente).

Propagación de las cepas DS-1 y Wa en células MA 104

Se utilizaron cepas de referencia de rotavirus humano Wa (genotipo G1P[8]) y DS-1 (genotipo G2P[4]) para los ensayos de actividad antiviral, detección de genoma viral y producción de proteínas virales. Células MA 104 se infectaron con los lisados correspondientes y se realizaron las titulaciones virales por medio de la tinción con inmunoperoxidasa (figura 4).

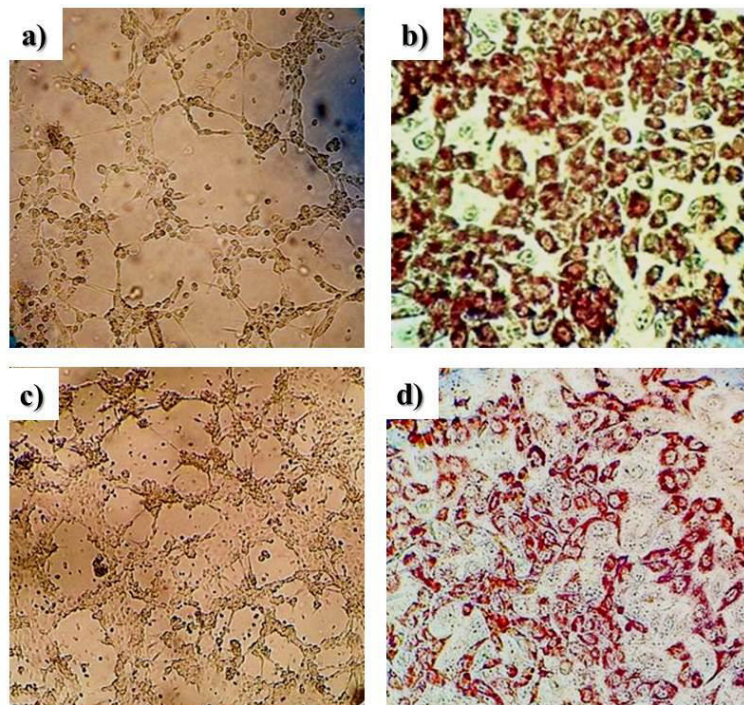


Figura 4. Propagación de rotavirus humano y su posterior titulación mediante tinción con inmunoperoxidasa. a) Células MA 104 infectadas con rotavirus DS-1 24 hpi (10x). b) Focos infecciosos producidos por la infección de rotavirus DS-1 teñidos con inmunoperoxidasa, título 1:32 (20x). c) Células MA 104 infectadas con rotavirus Wa 48 hpi (10x). d) Focos infecciosos producidos por la infección de rotavirus Wa teñidos con inmunoperoxidasa, título 1:16 (20x).

Fue posible el ajuste de los lisados a 0.1 MI (multiplicidad de infección) según el área celular a infectar. Los cálculos se realizaron en base a los títulos obtenidos para Wa (249 920 UFF/ml) y DS-1 (566, 720 UFF/ml) utilizando la fórmula previamente descrita. En este estudio, se observó una diferencia en cuanto al comportamiento de cada cepa viral sobre un cultivo celular *in vitro*. La cepa DS-1 presentó mayor efecto citopático y con mayor rapidez que la cepa Wa, además de presentar mayores títulos virales.

Obtención de extractos acuosos e hidro-etanólicos

Se adquirieron muestras desecadas de hojas, tallos y semillas de la planta *W. americana* (figura 5) en hierberas ubicadas en el centro de Monterrey, Nuevo León, México. Dicha planta es comercializada bajo el nombre común de “Tapacola” y está indicada contra malestares digestivos, colitis y diarreas principalmente. Incluso, es comercializada en combinación con otras plantas medicinales para el tratamiento de diarreas en infantes.



Figura 5. Ejemplar de *W. americana* de forma comercial. Porción de la planta desecada: hojas, tallos y flores utilizadas para el desarrollo de los extractos.

La planta fue utilizada para obtener los extractos acuosos e hidro-etanólicos con un volumen final de extracción de 500 ml para ambas extracciones. Se obtuvieron rendimientos diferentes tanto del extracto acuoso como el hidro-etanólico. Una vez determinado el peso de los extractos desecados, se observó que se obtuvo mayor peso del extracto hidro-etanólico desecado (figura 6).

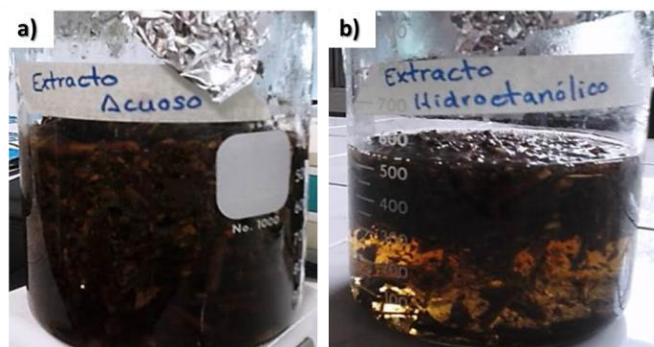


Figura 6. Rendimiento en peso de extractos pulverizados obtenidos a partir de 500 ml de extracto primario. Dichos pesos fueron solubilizados con agua bidestilada ajustados a una concentración inicial de 100 mg/ml. a) extracto acuoso 1.84 gramos de extracto. b) Extracto hidro-etanólico 2.46 gramos de extracto.

Lo anterior presupone una posible diferencia en la composición fitoquímica obtenida de los extractos y la respuesta de la planta a las soluciones utilizadas. Por lo tanto, la presencia de etanol en la extracción y el método de extracción utilizado mostraron una ventaja en cuanto al rendimiento de los extractos.

Evaluación de citotoxicidad con extractos acuosos e hidro-etanólicos

Se determinó la citotoxicidad *in vitro* de extractos acuosos e hidroetanólicos sobre células MA 104. Las diluciones de cada extracto comprendieron concentraciones de 50-0.024 mg/ml, cada ensayo fue realizado por duplicado. Posterior a 24 horas de incubación con los extractos, se observó un deterioro de las células tratadas en las concentraciones más altas (50-12.5 mg/ml) los cuales no permitieron la confluencia completa de los cultivos.

Se analizó el desarrollo de la monocapa celular para cada concentración de extracto y mediante observación microscópica fue posible determinar las concentraciones no citotóxicas de trabajo. La toxicidad de los extractos acuosos e hidro-etanólicos sobre las células MA 104 fue muy similar. Se registró una concentración citotóxica 50% (CC₅₀) de 1.56 mg/ml para ambas extracciones permitiendo la confluencia celular con un 50% de células dañadas (figura 7b-d). Asimismo, la concentración máxima de tolerancia (CMT) fue determinada en la concentración 0.39 mg/ml (figura 7c-e), en donde las células lograron la confluencia presentando una morfología similar al cultivo sin tratamiento con extractos (figura 7a).

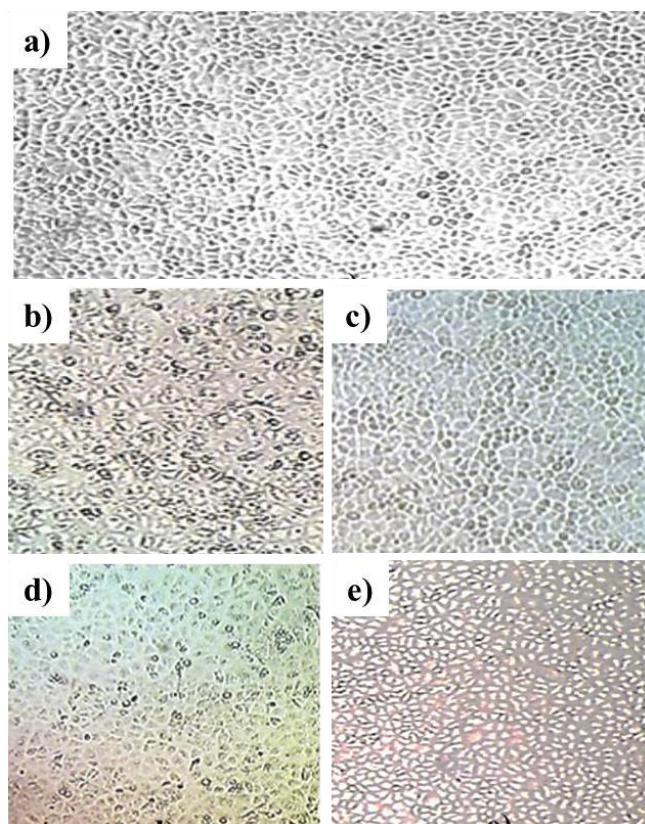


Figura 7. Efecto citotóxico de los extractos sobre células MA 104 mediante microscopía 20x. a) Control de cultivo celular en ausencia de extracto, b) CC₅₀ de extracto hidro-etanólico 1.56mg/ml, c) CMT de extracto hidro-etanólico 0.39 mg/ml, d) CC₅₀ de extracto acuoso 1.56 mg/ml, e) CMT de extracto acuoso 0.39 mg/ml.

Se logró observar los distintos daños que ocasiona cada extracto sobre las células MA 104. La citotoxicidad fue más visible en el extracto hidro-etanólico al observar un mayor daño celular en comparación con el extracto acuoso. Sin embargo, se coincidió en las concentraciones no citotóxicas determinadas para cada especie de extracción.

Evaluación del potencial antiviral de los extractos

Una vez obtenidas las concentraciones no citotóxicas de extractos, se realizaron ensayos de actividad antiviral utilizando la técnica de tinción de focos infecciosos con inmunoperoxidasa. Una vez cuantificados y promediados los focos infecciosos producidos en cada ensayo, se determinaron las concentraciones con actividad antiviral. Ambos tipos de extracción mostraron inhibición de focos infecciosos en un rango de 60-

100% en concentraciones de 0.008-0.5 mg/ml. Asimismo, los mayores porcentajes de inhibición se presentaron al agregar los extractos sobre los virus antes de la infección. Concentraciones de 0.1 mg/ml de extractos acuosos e hidro-etanólicos redujeron la producción de focos infecciosos en rangos de 94-99% para rotavirus Wa y de 97-99% para la cepa DS-1 (figura 8).

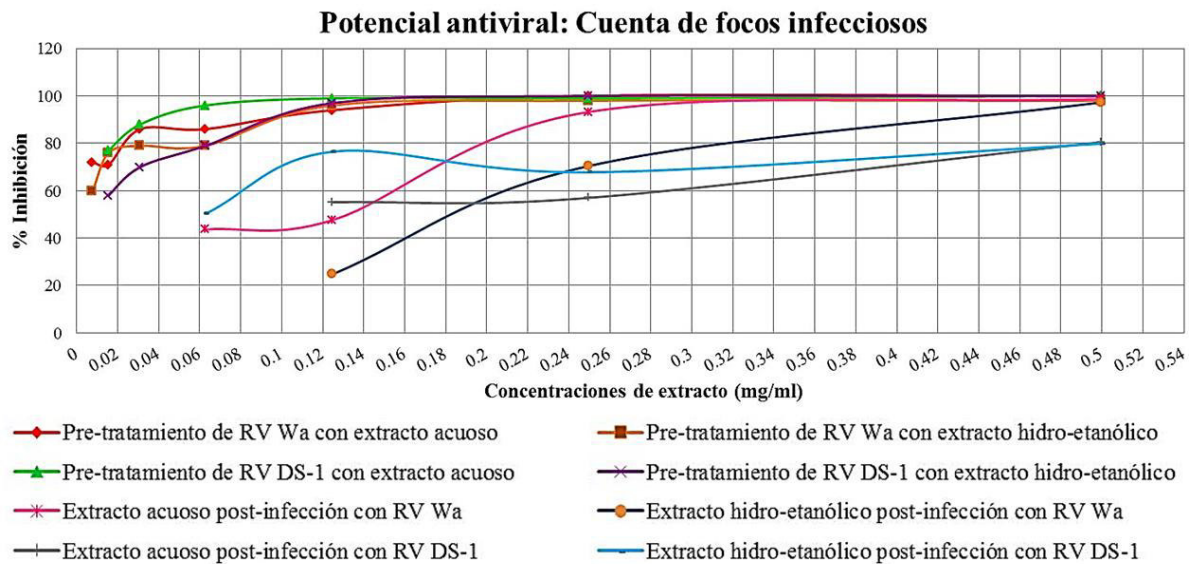


Figura 8. Porcentajes de inhibición de focos infecciosos detectados con anti-Wa en presencia de extractos acuosos e hidro-etanólicos antes o después de la infección.

Para la respuesta antiviral obtenida al agregar los extractos una hora posterior a la infección, el rango de concentraciones antivirales de extractos fue mayor. Dicha respuesta se presentó en concentraciones cercanas a la CMT. Tanto los extractos acuosos como los hidro-etanólicos alcanzaron porcentajes de inhibición por encima del 60% en las concentraciones de 0.25-0.5 mg/ml (figura 9). Por lo tanto, mayores concentraciones de extractos fueron requeridas para lograr una completa inhibición de focos infecciosos.

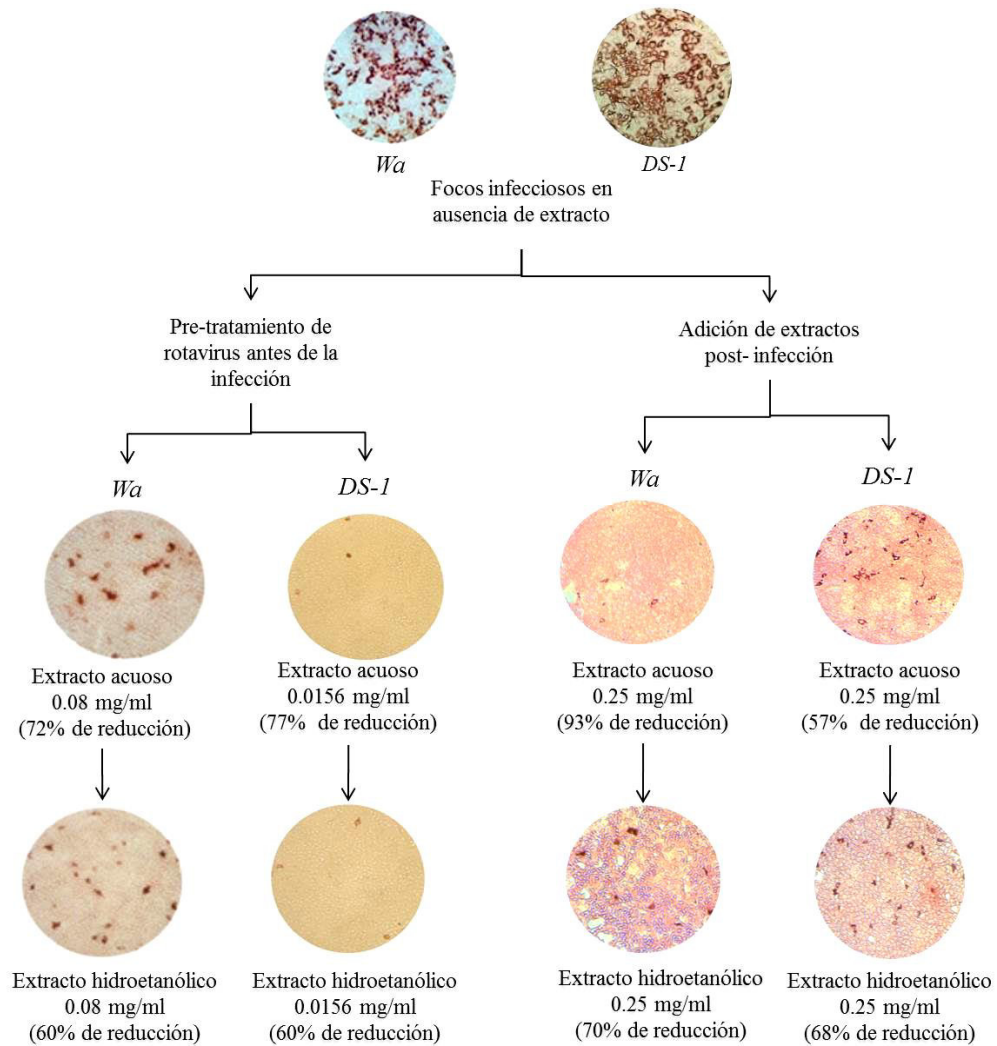


Figura 9. Reducción de focos infecciosos en las mínimas concentraciones efectivas obtenidas para cada tipo de extracción y tratamiento.

Asimismo, se observó que los extractos acuosos mostraron porcentajes de inhibición más altos que los extractos hidro-etanólicos al agregarse antes e incluso después de la infección con cepas Wa o DS-1. Durante los ensayos de actividad antiviral, se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra la partícula completa de rotavirus humano (partículas de triple capa). Dichos anticuerpos fueron obtenidos inmunizando conejos de Nueva Zelanda con lisados de rotavirus Wa. Debido a que los lisados poseen una gran cantidad de proteínas con capacidad inmunogénica (proteínas estructurales y no estructurales del virus, además de proteínas celulares), la detección de focos infecciosos involucra más de un tipo de anticuerpo.

Ensayos adicionales utilizando anticuerpos específicos contra la subunidad VP8* que corresponde a la proteína viral de superficie VP4 fueron realizados para confirmar los resultados obtenidos. La detección de focos infecciosos fue realizada solamente durante el pre-tratamiento de rotavirus antes de la infección, ya que obtuvo mayor respuesta antiviral. Los resultados obtenidos fueron similares al detectar la subunidad VP8* como al utilizar un anti-Wa de conejo (figura 10). Las concentraciones con porcentajes de inhibición de focos iguales o mayores al 60%, se presentaron en rangos desde 0.5 a 0.0156 mg/ml. Lo cual coincide con las concentraciones con potencial antiviral resultantes del primer ensayo.

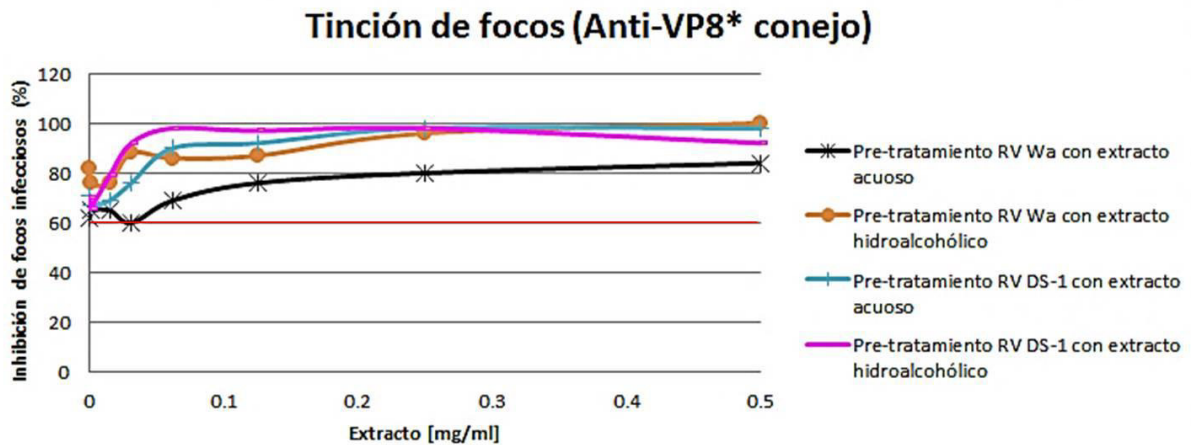


Figura 10. Porcentajes de inhibición de focos infecciosos detectados con anti-VP8* en presencia de extractos acuosos e hidro-etanólicos antes de la infección.

Lo anterior nos demuestra que el tipo de anticuerpo utilizado no influye en el reconocimiento del antígeno blanco en presencia de extractos. En esta ocasión, aunque no fue posible determinar la especie de extracto que tuvo mejor respuesta, el grado de inhibición de focos para la cepa DS-1 es ligeramente mayor a la registrada para la cepa Wa. Esto coincide con el ensayo de actividad antiviral obtenida al utilizar los anticuerpos contra la partícula completa, lo cual puede ser debido a que los anticuerpos utilizados en ambos casos tengan una mayor afinidad por la cepa Wa.

Efecto de los extractos sobre la partícula infectiva de rotavirus

Para determinar si la inhibición de focos infecciosos observada en presencia de extractos radica en el reconocimiento de los antígenos de superficie de rotavirus, se realizó un ensayo de ELISA indirecta. Lisados de rotavirus Wa y DS-1 fueron pre-tratados con concentraciones no citotóxicas de extractos antes de ser utilizados como antígenos para la sensibilización de las placas de 96 pozos. Posteriormente se utilizaron anticuerpos de detección contra la partícula completa y se compararon las absorbancias con los lisados obtenidos en ausencia de extractos (figura 11).

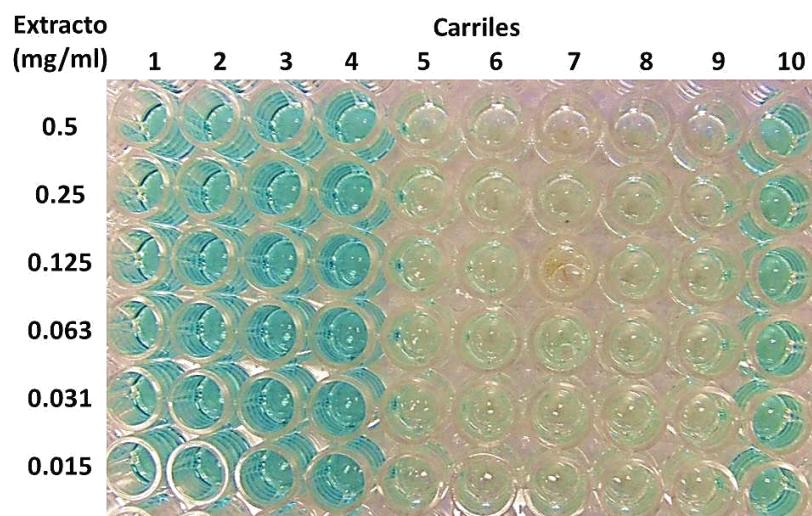


Figura 11. Distribución de las muestras en la placa de ELISA para evaluar el reconocimiento de rotavirus pre-tratado con extractos. Rotavirus Wa pre-tratado con extracto acuoso (carriles 1 y 2). Rotavirus Wa pre-tratado con extracto hidro-etanólico (carriles 3 y 4). Lisado celular no infectado en ausencia de extractos (carril 5). Extracto acuoso en ausencia de lisado viral (carriles 6 y 7). Extracto hidro-etanólico en ausencia de lisado viral (carriles 8 y 9). Lisados de rotavirus Wa en ausencia de extracto (carril 10).

Las absorbancias fueron mayores a 0.5 al sensibilizar las placas de ELISA con los virus pre-tratados. En cuanto a los lisados en ausencia de extracto, considerados controles, se registraron absorbancias entre 0.4 a 0.5, en contraste con las absorbancias de 0.1-0.2 obtenidos al sensibilizar con el blanco y los extractos solamente.

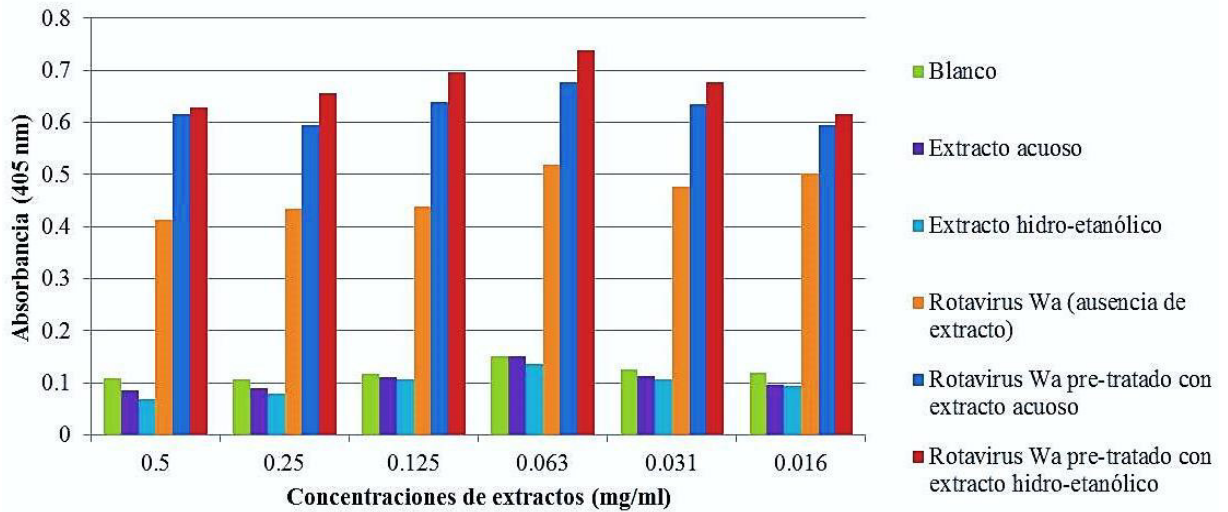


Figura 12. Absorbancias obtenidas en ELISA con rotavirus Wa pre-tratado con extractos acuosos e hidro-etanólicos utilizando el lector Digital and Analog Systems S.R.L. modelo A2.

Debido a que los virus pre-tratados sobrepasan las absorbancias obtenidas con el control, se consideró una reacción antígeno-anticuerpo positiva. Por lo tanto, el reconocimiento de partículas completas de rotavirus Wa y DS-1 no fue afectado en presencia de extractos (figura 12). Para determinar si el potencial antiviral observado actúa durante el ingreso del virus hacia la célula hospedera, se determinaron aspectos como producción de genoma y proteínas virales.

Análisis de RNA genómico

Se evaluó la capacidad de rotavirus humano (DS-1) para sintetizar RNA genómico durante su pre-tratamiento antes de la infección, así como al agregar extracto una hora post-infección. Para realizar este ensayo, se determinaron las horas post-infección en las cuales se realizaron las extracciones de RNA. Utilizando una placa de seis pozos para cultivo celular se sembraron células MA 104 en medio D-MEM suplementado con suero fetal de bovino 3% y una vez confluentes fueron infectadas con rotavirus humano DS-1 a una MI de 0.1. Cada pozo fue cosechado a diferentes tiempos post-infección: 4, 8, 12, 16 y 24 horas (figura 13).

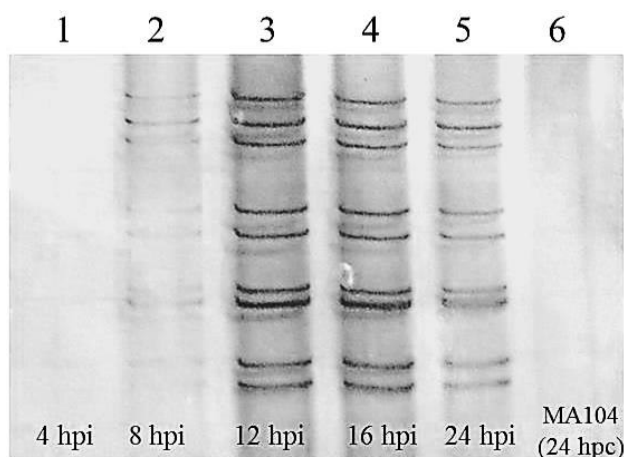


Figura 13. Síntesis de RNA de rotavirus DS-1 (MI 0.1) a diferentes tiempos de incubación en ausencia de extractos.

Lisados obtenidos a diferentes tiempos post-infección en ausencia de extractos fueron utilizados como control positivo para la síntesis de RNA genómico. Debido a que no se detectó suficiente cantidad de RNA para los lisados a las 4 y 8 horas post-infección (hpi), las cosechas se tomaron preferentemente después de las 12 hpi.

Asimismo, se eligió la concentración de 0.2 mg/ml del extracto hidro-etanólico para dicho análisis, ya que obtuvo buenos porcentajes de inhibición de focos infecciosos en todos los tratamientos para ambas cepas virales. Una vez conseguidos los lisados de rotavirus en presencia de extracto, se realizó una extracción de RNA total por el método Trizol. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% fue posible la visualización de los patrones cortos característicos de la cepa de rotavirus DS-1. Dichos patrones electroforéticos se observaron tanto en ausencia como en presencia de extracto hidro-etanólico (figura 14).

Lo anterior sugiere, que el virus logra penetrar a la célula hospedera e incluso comenzar la síntesis de genoma viral durante las primeras 24 horas en presencia de extracto. Asimismo, se observó que la intensidad de los segmentos génicos es semejante a las bandas teñidas en el lisado control (ausencia de extracto). Por lo tanto, el potencial antiviral observado anteriormente en la inhibición de focos infecciosos, no radica sobre la síntesis de RNA viral.

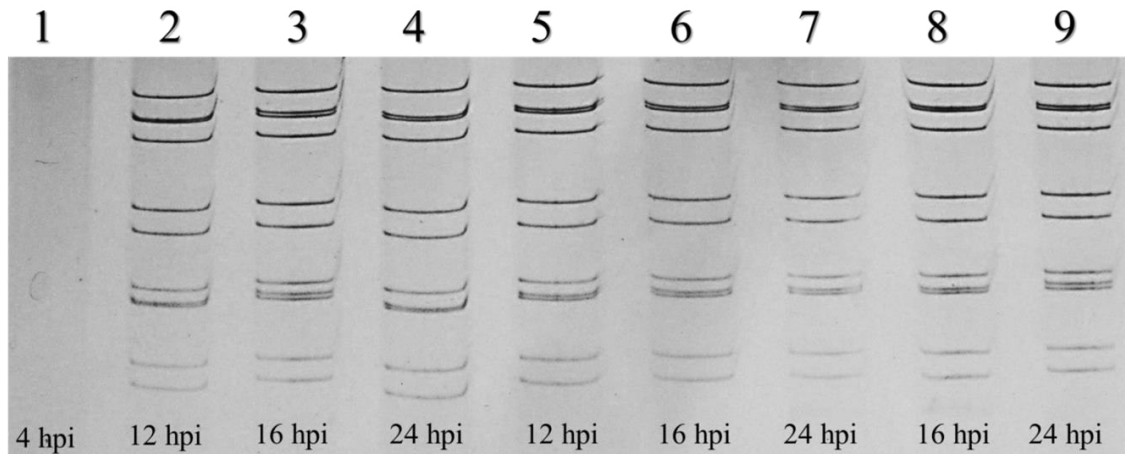


Figura 14. Síntesis de RNA de rotavirus DS-1 (MI 0.1) a diferentes tiempos de incubación en presencia de extracto. Carril 1: Lisado de células MA 104 no infectadas 4 horas post-incubación. Carriles 2-4: patrones electroforéticos de rotavirus DS-1 MI 0.1 en ausencia de extracto hidro-etanólico. Carriles 5-7: extracto hidro-etanólico 0.2 mg/ml agregado post-infección con rotavirus DS-1 MI 0.1. Carriles 8-9: rotavirus DS-1 MI 0.1 pre-tratado con extracto hidro-etanólico 0.2 mg/ml.

Para determinar si el tiempo de exposición al extracto influye sobre la síntesis de RNA genómico, se realizaron variantes del pre-tratamiento de rotavirus DS-1 antes de la infección. En todos los casos, el lisado viral fue pre-tratado con extracto hidro-etanólico y agregado sobre las células MA 104 durante una hora.

En el primer tratamiento las células fueron lavadas y el medio de cultivo fue renovado. Para el segundo tratamiento, se permitió el contacto de los virus pre-tratados sobre las células MA 104 por 24 horas (sin lavados previos). Por último, en el tercer tratamiento, las células fueron lavadas y el medio de cultivo fue mezclado con extracto hidro-etanólico durante 24 horas.

Todos los tratamientos fueron cosechados a las 24 hpi y extraídos por Trizol para obtener RNA total. De igual manera, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 8% y los patrones electroforéticos obtenidos fueron comparados con lisados virales en ausencia de extracto (figura 15).

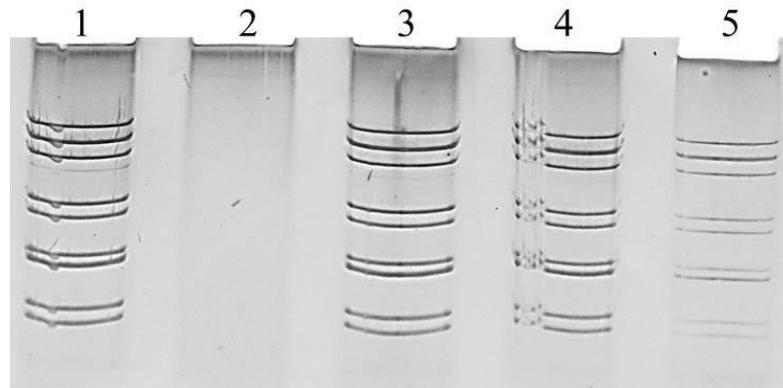


Figura 15. Síntesis de RNA de rotavirus DS-1 (MI 0.1) a diferentes tiempos de exposición con el extracto. Carril 1: rotavirus DS-1 en ausencia de extracto hidro-etanólico. Carril 2: lisado de células MA 104 no infectadas. Rotavirus DS-1 MI 0.1 en presencia de extracto con el primer tratamiento (carril 3), segundo tratamiento (carril 4) y tercer tratamiento (carril 5).

En todos los tratamientos, así como en los lisados en ausencia de extracto, fue posible la visualización de segmentos génicos. Sin embargo, se observó una considerable disminución en cuanto a la intensidad de las bandas en el tercer tratamiento. Durante dicho tratamiento, el extracto estuvo presente antes de la infección e incluso 24 horas después de la misma, lo que propone un efecto sobre la síntesis de RNA viral. Para asegurarse que la disminución de intensidad en el patrón electroforético no sea debido al proceso de extracción de RNA total, una segunda extracción fue realizada (figura 16).

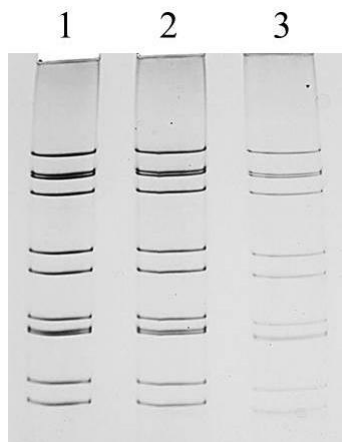


Figura 16. Segunda extracción con método Trizol de los lisados con los diferentes tratamientos a diferentes tiempos de exposición con el extracto.

Mediante una segunda extracción de los lisados virales, fue posible determinar que la permanencia del extracto hidro-etanólico a 0.2 mg/ml durante todo el curso de la infección, afecta en la síntesis de RNA. Lo anterior nos indica que como cualquier tratamiento antiviral, la respuesta del extracto es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al sistema celular.

Para determinar si el genoma de rotavirus observado en presencia de extracto es utilizado para la producción de proteínas víricas se realizó el análisis de las proteínas VP4 y NSP2 mediante Western blot. Debido a que la proteína no estructural NSP2 (vinculada en la formación de viroplasmatas y ensamblaje de rotavirus) no es utilizada comúnmente en el diagnóstico de rotavirus en el laboratorio, proteínas recombinantes fueron producidas en este estudio.

Obtención de proteínas NSP2 recombinantes

A partir de una reacción de RT-PCR y utilizando los primers descritos anteriormente, fue posible la amplificación del segmento 8 de rotavirus humano Wa y DS-1 (figura 17). Dicho segmento codifica para la proteína NSP2 de rotavirus, una proteína que sólo puede ser detectada durante el ciclo de replicación citoplasmática del virus. El fragmento obtenido correspondió a una región de 1042 nucleótidos (25-1049 nucleótidos del gen y 9 nucleótidos adicionales en cada extremo).

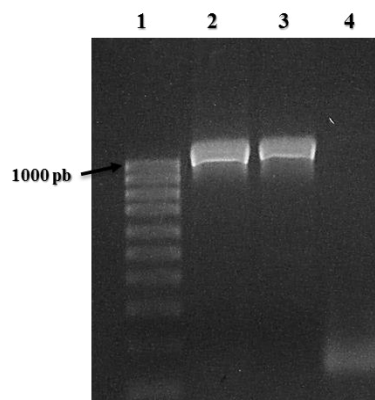


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% del fragmento 8 de rotavirus. Carril 1: Marcador de pares de bases (pb) HyperLeader IV (Bioline). Carril 2: rotavirus Wa, carril 3: rotavirus DS-1, carril 4: control PCR negativo.

Los fragmentos amplificados fueron clonados con el vector pGEM-T (Promega) utilizando bacterias *E. coli* DH5 α competentes. Posteriormente, los plásmidos fueron purificados mediante Kit Wizard[®] Plus SV minipreps DNA (Promega) y se analizó la presencia de plásmidos construidos mediante electroforesis en agarosa 1%. Los plásmidos construidos con el fragmento de interés fueron digeridos con enzimas de restricción BamHI y Sall debido a que los fragmentos contienen sitios de reconocimiento para dichas enzimas (figura 18).

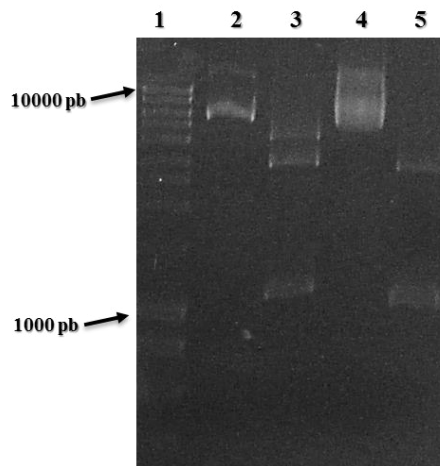


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de digestión enzimática entre el fragmento 8 de rotavirus y el plásmido de clonación. Carril 1: Marcador de pares de bases (pb) HyperLeader I (Bioline). Carril 2: pGEM-T/DS-1, carril 3: pGEM-T/DS-1 digerido, carril 4: pGEM-T/Wa y carril 5: pGEM-T/Wa digerido.

Una vez liberados los fragmentos, fueron secuenciados para asegurarse que pertenecían al segmento 8 de las cepas humanas de rotavirus Wa y DS-1 (figura 19). Las secuencias fueron analizadas utilizando los programas virtuales BioEdit v. 7.2.5 y BLAST protein (NCBI). Se encontró que las secuencias obtenidas poseen un alto porcentaje de identidad con las secuencias reportadas en la base de datos del GeneBank para la proteína NSP2 de rotavirus humano (figura 20).



Figura 19. Cromatograma de la secuencia nucleotídica obtenida por secuenciación del fragmento 8 clonado de rotavirus. Se utilizó el secuenciador ABIPRISM 310™ Genetic Analyzer.

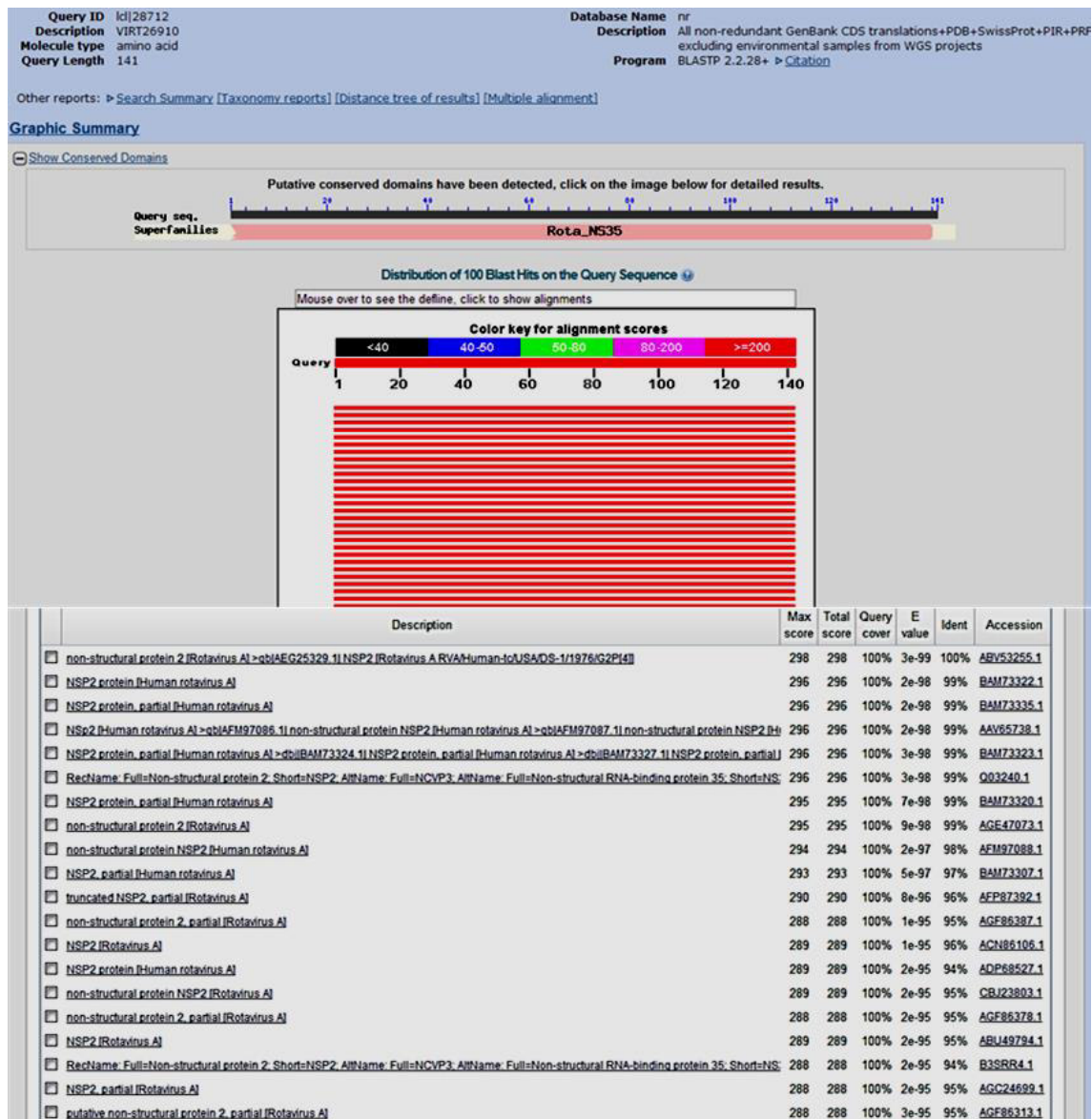


Figura 20. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del segmento 8 de rotavirus humano DS-1 obtenido en la secuenciación.

Después de confirmar la identidad de nuestros fragmentos, se ligaron en el vector de expresión pET-28a(+), previamente dicho vector fue digerido con las enzimas BamHI y Sall para abrirlo y crear los extremos adhesivos necesarios (figura 21). Una vez construido, el vector pET-28a/NSP2-DS-1 fue introducido en *E. coli* BL21 competentes para la posterior producción intracelular de proteínas recombinantes.

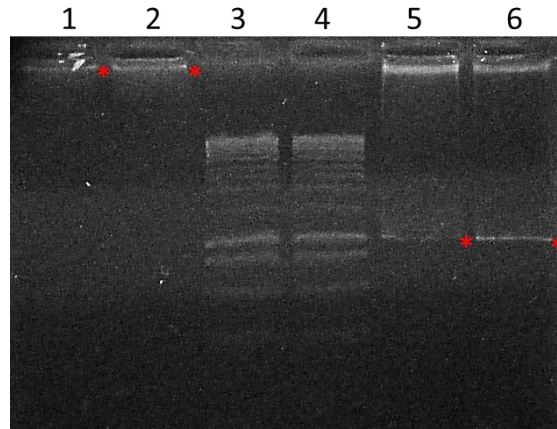


Figura 21. Productos de digestión enzimática entre el plásmido de expresión y el fragmento 8 de rotavirus. Gel de agarosa Low Melting 1.2%, los asteriscos indican los productos de las reacciones de restricción. Carriles 1 y 2: pET-28^a digerido; carriles 3 y 4: HiperLeader I (Bioline); carriles 5 y 6: pGEM-T/NSP2-DS-1 digerido.

Se identificaron las clonas bacterianas transformadas con el plásmido pET-28a/NSP2-DS-1 mediante análisis electroforético de los plásmidos purificados por lisis alcalina. Los plásmidos positivos por electroforesis fueron confirmados mediante PCR utilizando primers específicos pET-28F y pET-28R (figura 22).

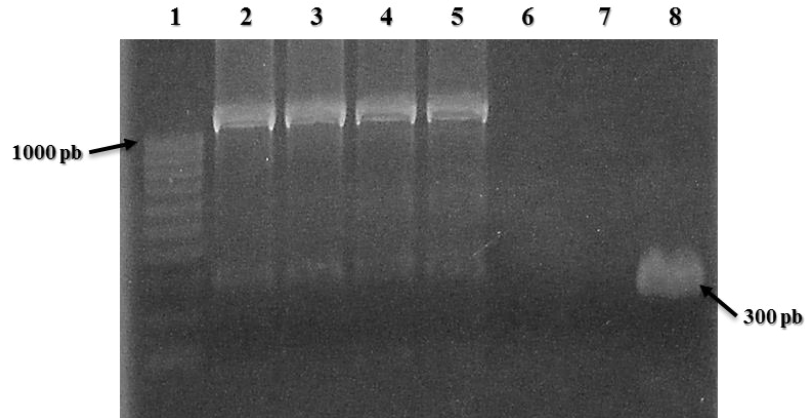


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% a partir de PCR confirmatoria para la ligación del plásmido de expresión y el fragmento 8 de rotavirus. Carril 1: Marcador de pares de bases (pb) HiperLeader IV (Bioline); carril 2: pET-28a/NSP2-DS-1 clona 1; carril 3: pET-28a/NSP2-DS-1 clona 2. Carril 4: pET-28a/NSP2-Wa clona 1; carril 5: pET-28a/NSP2-Wa clona 2. Carril 6: control PCR negativo; carril 8: control PCR positivo pET-28a sin inserto.

Las clonas positivas de bacterias *E. coli* BL21 transformadas fueron cultivadas en ausencia de antibióticos durante dos horas y media hasta que alcanzaron la densidad óptica adecuada. Posteriormente, fueron inducidas agregando IPTG al cultivo bacteriano e incubando nuevamente durante cinco horas. Se realizó la lisis bacteriana (química-mecánica) debido a que las proteínas recombinantes de interés quedan inmersas en el citoplasma de las bacterias.

Para evitar los cuerpos de inclusión que se puedan formar durante la expresión proteínica todos los lisados bacterianos se ajustaron a 8M de Urea. Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida 11% en condiciones desnaturalizantes se determinó la presencia de proteínas recombinantes tomando en cuenta un lisado de bacterias no inducidas como control negativo.

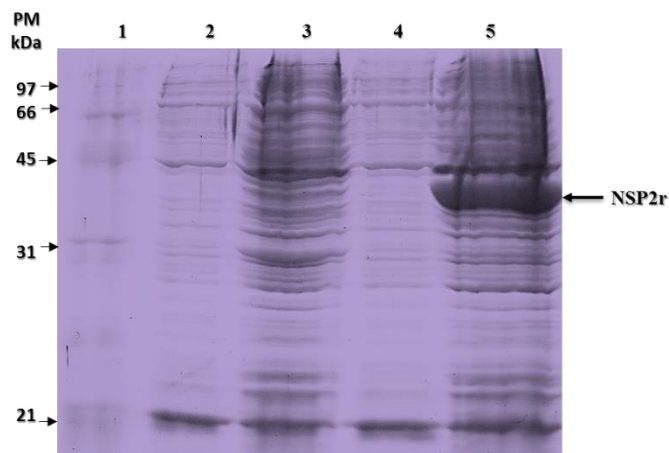


Figura 23. SDS-PAGE 11% a partir de los extractos bacterianos transformados. Carril 1: Marcador de talla molecular. Carril 2: Lisado de bacterias transformadas con pET-28a/NSP2-Wa sin inducir. Carril 3: Lisado de bacterias transformadas con pET-28a/NSP2-Wa inducidas con IPTG. Carril 4: Lisado de bacterias transformadas con pET-28a/NSP2-DS-1 sin inducir. Carril 5: Lisado de bacterias transformadas con pET-28a/NSP2-DS-1 inducidas con IPTG. Se observa una mancha intensa en los lisados de las bacterias transformadas con pET-28a/NSP2-DS-1 inducidas con IPTG que se ubica por debajo de los 45 kDa según el marcador de talla molecular.

A pesar de que la inducción fue realizada por igual para ambas bacterias transformadas, aquellas que poseían el vector pET-28a/NSP2-Wa no mostraron diferencia en cuanto al patrón electroforético de proteínas de bacterias inducidas y no inducidas. Por otro lado, las bacterias transformadas con pET-28a/NSP2-DS-1 mostraron una banda intensa por

debajo de los 45 kDa, lo que nos sugiere que las bacterias expresaron la proteína NSP2 (36 kDa aproximadamente). Por lo tanto, la purificación de proteínas recombinantes mediante columnas de afinidad His-Trap FF Crude fue realizada sólo para los lisados de bacterias transformadas con el vector pET-28a/NSP2-DS-1.

Una vez obtenidas las fracciones resultantes de la purificación de proteínas recombinantes se corrió un gel de poliacrilamida 11% en condiciones desnaturalizantes para asegurar la integridad de las proteínas recombinantes (figura 24). El gel fue teñido con Nitrato de plata 0.1% para aumentar la sensibilidad y resolución de las bandas proteicas en el gel de poliacrilamida.

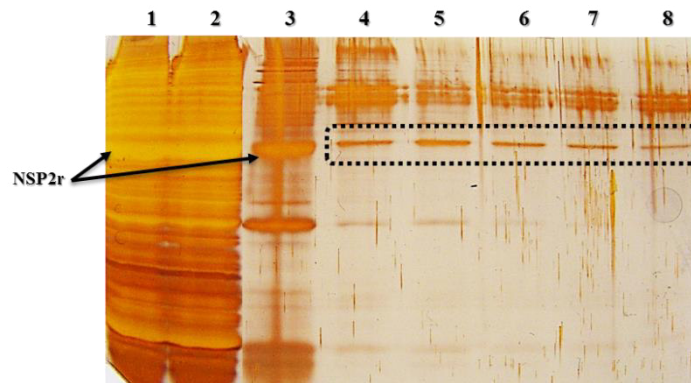


Figura 24. SDS-PAGE 11% de las fracciones de NSP2r obtenidas en la purificación por cromatografía de afinidad. Carril 1: Extracto de lisis bacteriana, carril 2: Eluente de purificación, carril 3: Mezcla de fracciones (concentración de proteína NSP2 recombinante), carril 4-8: Fracciones de purificación proteica.

La recuperación de proteínas con extremos de histidina, las cuales se presupone que se trata de NSP2 recombinante fue muy escasa. Según la intensidad de bandas en la electroforesis se determinó una concentración aproximada de entre 30 y 50 mg/ml en la mezcla de fracciones. Dicha mezcla fue utilizada para la inmunización de conejos para la producción de anticuerpos.

Efecto anti-rotavirus en la producción de proteínas virales

Lisados obtenidos en el análisis de RNA viral fueron utilizados para la detección de proteínas virales en ensayos de Western blot. Para la detección de la proteína VP4 en

lisados con ausencia y presencia de extracto hidro-etanólico a 0.2 mg/ml, se utilizaron anticuerpos dirigidos contra la subunidad VP8* de rotavirus Wa producidos en conejo a una dilución de 1:500. Dichos anticuerpos fueron capaces de reconocer lisados de rotavirus DS-1 en ausencia e incluso en presencia de extracto hidro-etanólico (figura 25).

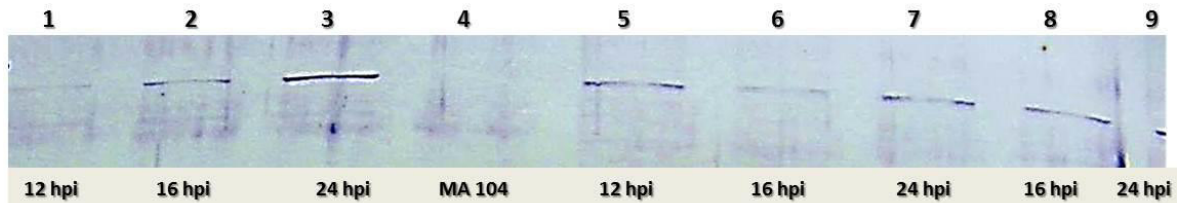


Figura 25. Western blot utilizando anti-VP8* de rotavirus Wa como anticuerpo de detección en lisados con ausencia o presencia de extracto. Lisados de rotavirus DS-1 MI 0.1 en ausencia de extracto hidro-etanólico (carriles 1-3). Lisado de células MA 104 no infectadas (carril 4). Extracto hidro-etanólico 0.2 mg/ml agregado post-infección con rotavirus DS-1 MI 0.1 (carriles 6-7). Rotavirus DS-1 MI 0.1 pre-tratado con extracto hidro-etanólico 0.2 mg/ml (carriles 8 y 9).

En los lisados en ausencia de extracto, se observó una banda de reactividad que se ubica justo por debajo de los 99 kDa. Dicha banda aumenta de intensidad a medida que aumenta el periodo de infección. Por otro lado, en el lisado celular en ausencia de virus no se observó dicha banda, lo que sugiere que se trata de la proteína VP4 de rotavirus (86 kDa).

En los lisados donde se agregó el extracto una hora post-infección se observaron bandas de reactividad, sin embargo la intensidad no fue proporcional al periodo de infección. En los lisados obtenidos en presencia de extractos a las 24 hpi (horas post-infección) se muestran con menor intensidad que en ausencia de extracto. Esto indica que si bien la producción de la proteína estructural VP4 tiene lugar, la presencia de extracto parece afectar en la concentración de proteína producida.

Reactividades similares fueron obtenidas durante la detección de NSP2 en lisados tratados y no tratados con el extracto. En esta ocasión, se utilizó el anti-NSP2 producido en conejo a una dilución de 1:200. La concentración de los anticuerpos utilizados fue

más alta debido a que respuesta inmunológica del animal frente a la cantidad de proteína recombinante utilizada fue muy baja.

Utilizando anticuerpos dirigidos contra rotavirus DS-1 completo a una dilución de 1:500, se realizó un Western blot con los lisados virales anteriores. Debido a que el anticuerpo es policlonal, se observó una mayor detección de proteínas virales en los lisados tratados y no tratados de rotavirus humano 24 horas post-infección. Se añadió un marcador de talla molecular para deducir las proteínas virales según la migración de las bandas de reactividad (figura 26).

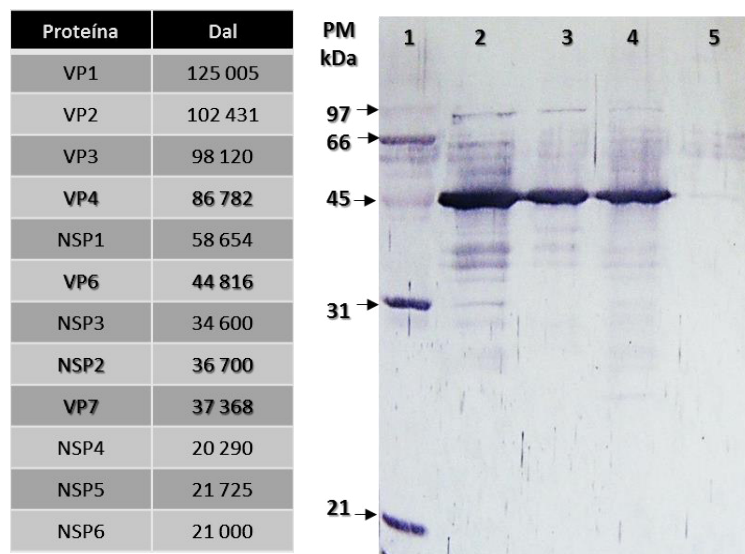


Figura 26. Western blot de lisados virales en presencia o ausencia de extracto cosechados 24 hpi utilizando anti-DS-1 para la detección. Carril 1: Marcador de talla molecular, carril 2: Lisado de rotavirus DS-1 en ausencia de extracto, carril 3: Pre-tratamiento de rotavirus DS-1 con extracto hidro-etanólico (0.2 mg/ml), carril 4: Lisados de rotavirus DS-1 añadiendo extracto post-infección, carril 5: Lisado de células MA 104 sin infectar.

Al igual que en el primer ensayo de Western blot, en este caso fue posible la detección de VP4, la cual disminuye visiblemente su intensidad en los lisados con extracto hidro-etanólico. Además, se presentó una banda de reactividad muy intensa que migró cerca de los 45 kDa, la cual según los pesos moleculares puede tratarse de la proteína de capa intermedia: VP6. Dicha banda de reactividad también disminuye en los lisados en presencia de extracto. Asimismo, el lisado en ausencia de extracto presentó dos bandas que migran entre 45 y 31 kDa, las cuales no se detectan en los lisados tratados con

extractos. Según sus migraciones nosotros suponemos la identificación de VP7 y NSP2, debido a su importancia y grado de expresión en una infección por rotavirus.

Estas bandas son casi imperceptibles los lisados en presencia de extracto, lo cual indica una notable disminución en la detección de dichas proteínas. Ninguna proteína viral fue detectada en lisados celulares sanos la cual fue nuestro control de reactividad negativa. En base a los resultados obtenidos, el extracto hidro-etanólico permite la producción de proteínas virales. Sin embargo, se observó un efecto en la cantidad de proteínas producidas al compararse con lisados virales en ausencia de extracto.

Por último, lisados obtenidos de las variaciones del pre-tratamiento al virus durante la determinación de RNA viral (véase figura 16) fueron analizados mediante un ensayo de Western blot. En esta ocasión, se utilizó una mezcla de anticuerpos para asegurar que las bandas de reactividad visualizadas por separado repitieran los patrones de migración esperadas. Una mezcla de anti-VP8*, anti-NSP2 y anti-DS-1 fueron agregadas en diluciones de 1:500 y 1:200 respectivamente (figura 27).

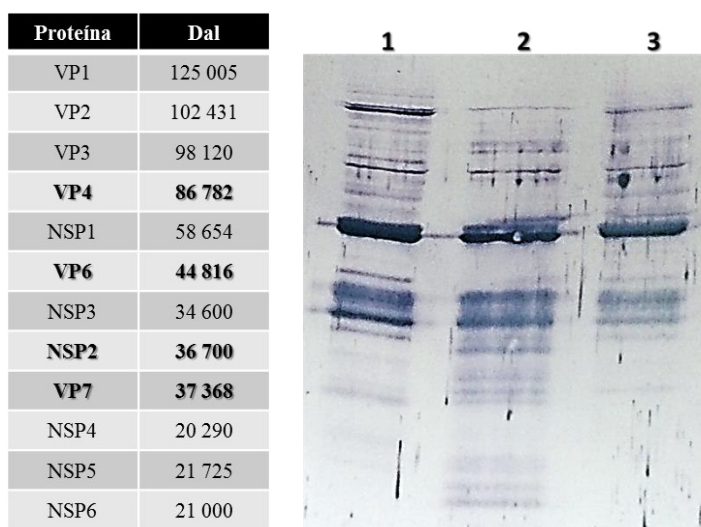


Figura 27. Western blot de la producción de proteínas virales de rotavirus DS-1 (MI 0.1) a diferentes tiempos de exposición con el extracto hidro-etanólico 0.2 mg/ml. Carril 1: Rotavirus DS-1 pre-tratado con extracto y agregado 1 hpi sobre células MA 104 (tratamiento 1). Carril 2: Rotavirus DS-1 pre-tratado con extracto y agregado 24 hpi sobre células MA 104 (tratamiento 2). Carril 3: Rotavirus pre-tratado con extracto y agregado 1 hpi sobre células MA 104, posteriormente el extracto se renovó y se dejó 24 hpi adicionales (tratamiento 3).

Al igual que los resultados obtenidos en la determinación de RNA viral, el ensayo de Western blot mostró una disminución en las bandas de reactividad de las proteínas detectadas en el tercer tratamiento. En base a las proteínas detectadas y sus migraciones, se confirmó la presencia de VP4, VP6, VP7 y NSP2.

En el lisado correspondiente al tratamiento 1, se detectó una serie de proteínas, las cuales varían en cuanto a cantidad e intensidad respecto a los carriles de los tratamientos 2 y 3. De tal manera que al agregar (en un solo sistema de infección) extracto hidroetanólico una hora durante el pre-tratamiento del virus y 24 horas después de la infección, fue posible disminuir notablemente la síntesis de proteínas estructurales y no estructurales.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, extracciones acuosas e hidro-etanólicas de *W. americana* fueron capaces de reducir visiblemente la infección de cepas humanas de rotavirus *in vitro*. Para este fin, células de riñón de mono verde africano (MA 104) fueron utilizadas. Dichas células primarias (embrionarias) son ampliamente utilizadas como un modelo bien estandarizado para la infectividad eficiente de diferentes cepas de rotavirus (Suzuki, *et al.* 1981; Ward, *et al.* 1984; Aboudy, *et al.* 1989).

Sin embargo, la eficiencia de propagación de rotavirus en cultivo celular es variable dependiendo el tipo de cepa. Obteniendo producciones de 1 a 3 logaritmos menos para cepas humanas comparadas con cepas de origen animal (Arnold, *et al.* 2009). Multiplicidades de infección entre 0.05 y 0.1 han sido reportadas como óptimas para obtener altos títulos virales de rotavirus Wa sobre células MA 104 (Offit, *et al.* 1983; Chang, *et al.* 1999). Debido a que la densidad celular influye en gran medida la propagación de rotavirus durante la infección, se estandarizó la capacidad infectiva de las cepas humanas Wa y DS-1 de rotavirus ajustando a MI de 0.1 para los ensayos realizados en este estudio.

Extractos acuosos e hidro-etanólicos fueron realizados a partir de hojas, semillas y tallos de *W. americana*. Dichos métodos de extracción fueron elegidos debido a que numerosos estudios han reportado efectos antimicrobianos y terapéuticos utilizando extracciones con agua, etanol, o bien extractos hidro-etanólicos (Matsuse *et al.*, 1999; Rojas, *et al.* 2010; Zongo, *et al.* 2013a; Zongo, *et al.* 2013b). Además, la gran mayoría de las afecciones reportadas que son tradicionalmente tratadas con esta planta, se utilizan en forma de decocciones.

En el presente estudio, concentraciones no citotóxicas de los extractos fueron determinados mediante microscopía directa sobre células MA 104. Bajas concentraciones de extractos 0.008-0.039 mg/ml permitieron la confluencia completa de

los cultivos celulares a 48 horas post-incubación. Por otro lado, concentraciones por encima de 0.5 mg/ml y hasta 50 mg/ml fueron capaces de alterar la morfología y desarrollo celular considerándose tóxicas sobre cultivo celular. Investigaciones utilizando extractos de *W. indica* administrados vía intra-peritoneal han reportado dosis letales de 500 mg/kg utilizando la planta completa, 141 mg/kg utilizando hojas y 363 mg/kg de tallos (Dhar, *et al.* 1973; Mohammed, *et al.* 2007). Por otro lado, el extracto hidro-etanólico mostró una dosis letal más alta de 875 mg/kg (Hamidu, *et al.* 2008).

Aunque las investigaciones reportadas *in vivo* muestran una diferencia de toxicidad según el tipo de extracción acuosa o alcohólica, los resultados de citotoxicidad obtenidos en este trabajo no mostraron alguna diferencia en cuanto al potencial tóxico *in vitro*. Debido a que los registros de toxicidad son muy escasos, no existen datos acerca de afecciones en órganos específicos ni reacciones secundarias en humanos (Zongo, *et al.* 2013a). Sin embargo, se encontró que el uso de esta planta es limitada durante el embarazo (Leonard, 2010).

Para determinar el potencial anti-rotavirus de los extractos obtenidos, ensayos de reducción de focos infecciosos fueron realizados mediante tinción con inmunoperoxidasa. Esto debido a que esta técnica de tinción es ampliamente utilizada para la detección, cuantificación, y capacidad de difusión viral en cultivo celular (Cevenini, *et al.* 1984; Zentner, *et al.* 1985; Payment, *et al.* 1985). Asimismo, posee una sensibilidad del 63.3% y 100% de especificidad frente la detección de rotavirus humano utilizando sueros de pacientes infectados (Weber, *et al.* 1992).

Estudios de neutralización con anticuerpos, han mostrado reducción de focos infecciosos al tratar cepas de rotavirus con anticuerpos específicos antes de la infección (Arias, *et al.* 1989; Contreras, *et al.* 1995; Menchaca, *et al.* 1998; Ludert, *et al.* 2002). En estas investigaciones, el título neutralizante es la máxima dilución donde se genere un 60% de reducción de focos (Asensi, *et al.* 2006). Dicho criterio, fue adaptado a nuestros ensayos

utilizando extractos acuosos e hidro-etanólicos para determinar las concentraciones efectivas sobre la infección de rotavirus.

Las detecciones de partículas virales con anti-rotavirus, o bien, con anti-VP8* fue realizada en un lapso de 14 hpi. Esto debido a que estudios indican que a partir de las 12 horas de infección los niveles máximos de producción viral son logrados *in vitro* (Ayala-Breton, *et al.* 2009). Asimismo, se ha indicado que la proteína VP4 puede detectarse en la membrana plasmática de la célula a partir de las 3 hpi (Nejmeddine, *et al.* 2000; Sapin, *et al.* 2002).

Nuestros resultados mostraron reducciones de focos infecciosos mayores al 60% agregando extractos antes e incluso después de la infección por rotavirus Wa G1P[8] y DS-1 G2P[4]. Asimismo, se observó una curva dosis-reducción de focos en la detección con sueros anti-rotavirus producidos en conejo y anticuerpos específicos contra la subunidad VP8* del virus.

Resultados similares fueron reportados por Andrés y colaboradores utilizando isoflavonas aislados de fórmulas infantiles (Andrés, *et al.* 2007). Los compuestos fueron agregados sobre las células antes y después de la infección, o bien, mezclados con rotavirus porcino OSU antes de la infección. En todos los tratamientos, se obtuvieron porcentajes de inhibición de focos infecciosos entre 25-61%. Estos porcentajes, al igual que en este trabajo, fueron obtenidos mediante la tinción de focos con inmunoperoxidasa. Sin embargo los porcentajes de inhibición obtenidos para *W. americana* fueron mayores utilizando cepas de rotavirus humano como modelo de estudio.

Asimismo, se han determinado compuestos que disminuyen en un 50% el efecto citopático de rotavirus Wa G1P[8] en células MA 104 agregados sobre las células minutos antes de la infección viral (Bae, *et al.* 2000; Savi, *et al.* 2010). Sin embargo, estos estudios carecen de ensayos post-infección o de algún ensayo concluyente.

Por otro lado, extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Alpinia katsumadai* mostraron un efecto antiviral al ser agregados solamente en el pre-tratamiento de rotavirus animal G8P[7] y G5P[7]. Dicha actividad fue confirmada al demostrar que los extractos inhibieron la capacidad hemaglutinante de los virus sugiriendo que la actividad antiviral radica en la interacción directa con VP4 (Kim, *et al.* 2012). Lo anterior contrasta con el presente estudio, ya que a pesar de la actividad observada durante el pre-tratamiento con los extractos, los resultados obtenidos por ELISA indirecta indicaron que el reconocimiento de rotavirus por anticuerpos policlonales no es afectada durante el pre-tratamiento con extractos acuosos e hidro-etanólicos.

En otro estudio se utilizó un ensayo similar de ELISA tipo sándwich, se determinó que las proantocianidinas generan agregados que contribuyen a la pérdida de antigenicidad de rotavirus SA11 (Lipson, *et al.* 2003). Asimismo, dicha actividad anti-rotavirus fue justificada por la inhibición de hemaglutinación. A diferencia de estos reportes, nuestros resultados indican que si bien hay reducción de focos infecciosos durante el pre-tratamiento, la actividad no parece efectuarse directamente sobre la partícula viral.

Para obtener un panorama más amplio de la actividad observada por los extractos, y debido a la actividad antiviral observada durante la presencia de extracto post-infección, se realizaron estudios para evaluar la influencia de *W. americana* sobre los eventos posteriores a la entrada de rotavirus. Se han reportado compuestos fito-químicos capaces de actuar en etapas posteriores a la entrada de rotavirus a la célula hospedero. Tal es el caso del Ácido 18- β -glicirretínico (*Glycyrrhiza spp.*), el cual disminuyó un 99% la infectividad de RRV determinada por unidades de focos inmuno-fluorescentes post-infección (Hardy, *et al.* 2012).

En los ensayos de síntesis de genoma viral, se obtuvieron patrones electroforéticos en presencia de extracto con intensidades muy similares al control sin tratamientos. Se observó que la presencia de extracto hidro-etanólico no afectó la síntesis de dsRNA al

agregarse antes o después de la infección. Sin embargo, al combinar el tiempo de exposición al extracto (adición antes y después de la infección durante el mismo sistema), disminuyó visiblemente la intensidad de los patrones electroforéticos.

Estudios sobre la replicación *in vitro* de RRV, han revelado que es posible observar un aumento exponencial a partir de las 4 hpi tanto de RNAm, como dsRNA. Esto es debido a la aparición de nuevas partículas DLP transcripcionalmente activas durante el curso de la infección, siendo a partir de las 12 hpi donde se alcanza un punto máximo de síntesis (Ayala-Breton, *et al.* 2009). Lo anterior fue confirmado en el lisado control donde la intensidad de patrones electroforéticos fue detectable a partir de las 8 hpi y completamente visibles después de las 16 hpi.

Debido a que las nuevas partículas de doble capa son ensambladas dentro de viroplasmos, los fragmentos recién sintetizados de dsRNA son acumulados y empaquetados dentro de dichas estructuras como ventaja de protección contra RNAsas del hospedero (Silvestri, *et al.* 2004; Carreño-Torres, *et al.* 2010; Contin, *et al.* 2011). Por lo tanto, en nuestros resultados la presencia de genoma viral pre-infección y post-infección, indican que la actividad de los extractos observada en la reducción de focos no radica en la adhesión o penetración viral.

Otro evento analizado en este estudio fue la producción de proteínas virales. En donde fue posible la detección de VP4, VP6, VP7 y NSP2 mediante Western blot. Se observó una disminución considerable de dichas proteínas en lisados con extracto agregado antes e incluso después de la infección. De igual manera, Hardy y colaboradores evaluaron la producción de proteínas virales VP2, VP6 y NSP2, durante el tratamiento post-infección con Ácido 18- β -glicirretínico. Ensayos revelaron una disminución considerable en la producción de dichas proteínas durante el post-tratamiento comparadas con el control (Hardy, *et al.* 2012). Esto sugiere, que la disminución de proteínas afecta de alguna manera la producción de focos infecciosos.

Específicamente, las reducciones en producción proteica pueden repercutir en los procesos de ensamblaje y salida de las partículas infecciosas. Diversos estudios han revelado que la disminución de VP4 produce TLPs sin capacidad para infectar células circundantes, observándose reducciones a un 25% en la infectividad (Dector, *et al.* 2002; Arias, *et al.* 2004; Ruiz, *et al.* 2009). Asimismo, el silenciamiento de VP7 ocasiona una infectividad del 30% y acumulación de DLPs en el citoplasma (Ruiz, *et al.* 2009). Se ha reportado, que el silenciamiento de VP6 provee cierta ventaja al hospedero, registrando un aumento de en la producción de proteínas celulares (Carreño-Torres, *et al.* 2010). Por último, estudios indican que la falta de NSP2 afecta severamente la replicación del genoma viral, la expresión de los RNAm y la formación de viroplasmos (Carreño-Torres, *et al.* 2010).

Por otro lado, aunque los reportes acerca de las propiedades terapéuticas de del género *Waltheria* son numerosos, los estudios utilizando virus de diversa naturaleza genómica no han reportado una actividad antiviral significativa (Maregesi, *et al.* 2008). Sin embargo, se ha comprobado que utilizando extracto acuoso de ramas de *W. indica* (48 µg/ml) es capaz de inhibir directamente la actividad enzimática de la proteasa de HIV en un 50% (Matsuse, *et al.* 1999).

Diversos de flavonoides de *W. indica* con propiedades anti-microbianas se han aislado, principalmente de sus partes aéreas (Petrus, 1990; Rao, *et al.* 2005; Maheswara, *et al.* 2006). Asimismo, algunos investigadores han reportado la actividad antiviral específica de flavonoides aislados de diversas plantas frente a la infección de rotavirus (Bae, *et al.* 2000; Shaneyfelt, 2006; Andres, *et al.* 2007; Savi, *et al.* 2010; Kim, *et al.* 2012; Lipson, *et al.* 2013). Estos compuestos fitoquímicos son moderadamente solubles en agua y etanol (Bahor, *et al.* 1999; Baker, *et al.* 1995). Por lo tanto, se sugiere que los flavonoides presentes en los extractos probablemente colaboren en la actividad anti-rotavirus demostrada en este proyecto.

Es posible, que la reducción de proteínas virales observadas en este estudio sea una consecuencia de la actividad ejercida por el extracto hidro-etanólico de *W. americana*. En nuestro conocimiento, este es el primer reporte de actividad anti-rotavirus de *W. americana*. No obstante, es necesario continuar evaluando los efectos de esta planta en etapas de morfogénesis viral, o bien, sobre las actividades metabólicas de la célula hospedera para tener un mejor entendimiento de las propiedades antivirales de esta planta.

CONCLUSIONES

- Extracciones acuosas e hidro-etanólicas de *W. americana* son capaces de reducir desde un 60-100% la producción de focos infecciosos de rotavirus humano sobre células MA 104 al agregarse antes e incluso después de la infección viral.
- Los extractos evaluados no modifican las propiedades antigénicas de rotavirus humano Wa y DS-1. Lo cual indica que el virus pre-tratado es capaz de unirse a los receptores de la célula hospedera.
- Extracto hidro-etanólico de *W. americana* aplicado en el pre-tratamiento del virus, o bien, una hora posterior a la infección permiten la síntesis de genoma viral así como la producción de proteínas virales. Sin embargo, efectos sobre la concentración de proteínas producidas en comparación con el control sin tratamientos fueron observados.
- Es posible disminuir la concentración de genoma y proteínas virales producidas, aumentando el tiempo de exposición del extracto hidro-etanólico (aplicación pre y post-infección en un mismo sistema).
- Estudios posteriores serán necesarios para determinar si el efecto antiviral observado es debido a una interacción directa con alguna ruta metabólica de la célula hospedera y no esencialmente con la morfogénesis y mecanismos de rotavirus.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aboudy Y, Shif I, Gotlieb-Stematsky T. 1989. Efficiency of isolation of human rotavirus in primary African green monkey kidney cells. *J Virol Methods*. 25:251-157.
2. Andres A, Donovan SM, Kuhlenschmidt TB, Kuhlenschmidt MS. 2007. Isoflavones at Concentrations Present in Soy Infant Formula Inhibit Rotavirus Infection in Vitro. *American Society for Nutrition J. Nutr.* 137:2068-2073
3. Arias C, Torres D. 2001. Fisiopatología de la infección por rotavirus. *Paediátrica. Asociación de Médicos Residentes del Instituto Especializado de Salud del Niño.* 4(1): 21-27.
4. Arias CF, Dector MA, Segovia L, Lopez T, Camacho M, Isa P, Espinosa R, Lopez S. 2004. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res* 102:43–51.
5. Arias CF, García G, Lopez S. 1989. Priming for rotavirus neutralizing antibodies by a VP4 protein-derived synthetic peptide. *Journal of Virology.* 63(12):5993.
6. Arias FC, *et al.* 1986. Synthesis in *Escherichia coli* and Immunological Characterization of a Polypeptide Containing the Cleavage Sites Associated with Trypsin Enhancement of Rotavirus SA11 Infectivity. *J. gen, Virol. Nov;* 68, 633-642.
7. Armah GE, Sow SO, Browman RF, *et al.* 2010. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet* 376:606–614
8. Arnold M, Patton JT, McDonald SM. 2009. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr Protocol Microbiol.* Doi: 100.1002/9780471729259.mc15c03s15.
9. Asensi MT, Martínez-Costa C, Buesa J. 2006. Anti-rotavirus antibodies in human milk: Quantification and neutralizing activity. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* 42:560-567.

10. Ayala-Breton C, Arias M, Espinosa R, Romero P, *et al.* 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *Journal of Virology*. 83(17):8819-8831.
11. Bae E-A, Han MJ, Lee M, Kim D-H. 2000. *In vitro* inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. *Biol. Pharm. Bull.* 23(9):1122-1124.
12. Bahor A, Siddequi A. 1999. Bioactive naturally occurring flavonoids. *Hamdard Medicus*. 52(1).
13. Baker W, Ollis WD. 1995. Recent development in the chemistry of natural phenolic compounds. *Nature for rsch.* 50:311-312.
14. Baudilio J. 2008. Revisión taxonómica del género *Waltheria* L. (Sterculiaceae) en Venezuela. *Ernstia*, 18:07-36.
15. Binka E, Vermund SH, Armah GE. 2011. Rotavirus diarrhea among children less than 5 years of age in urban Ghana. *Pediatr Infect Dis J.* 30(8):716-718.
16. Bishop R, Davidson G, Holmes I, Ruck B. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet* 1281-1283.
17. Blanckaert I, Vancraeynest K, Swennen RL, Espinosa-García FJ, *et al.* 2007. Non-crop resources and the role of indigenous knowledge in semi-arid production of Mexico. *Agriculture Ecosystems & Environment*. 119:39-48
18. Burkill HM. 2000. *The useful plants of West Tropical Africa*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. 686 p.
19. Carreño-Torres JJ, Gutiérrez M, Arias CF, López S, Isa P. 2010. Characterization of viroplasm formation during the early stages of rotavirus infection. *Virology Journal*. 7:350. Disponible_online: [<http://www.virologyj.com/content/7/1/350>]
20. Cartaya O, Reynaldo I. 2001. (Reseña bibliográfica) Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. 22(2):5-14.
21. Cevenini R, Rumpianesi F, Mazzarachio R, Donati M, Falcieri E, Sarov I. 1984. A simple immunoperoxidase method for detecting enteric adenovirus and rotavirus in cell culture. *Journal of Infection*. 8:22-27.

22. Chandran A, Fitzwater S, Zhen A, Santosham M. 2010. Review: Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. *Biologics: Targets & Therapy*. 4:213-229.
23. Chang KH, Park C-H, Park JH, Chung IS. 1999. Optimal cell density and multiplicity of infection for the propagation of human rotavirus in monkey kidney cells. *Biotechnology Techniques*. 13(11):757-759.
24. Chingwaru W, Majinda RT, Yeboah SO, Jackson JC, *et al.* 2011. Research article: *Tylosema esculentum* (Marama) Tuber and Bean extracts are strong antiviral agents against rotavirus infection. *Evidence-Based complementary and alternative medicine*. Hindawi Publishing Corporation. *Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 284795, 11 pages doi:10.1155/2011/284795
25. Clarkson C, Maharaj VJ, Crouch NR, Grace OM, *et al.*, 2004 In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *Journal Ethnopharmacological*. 92:177-191
26. Comité Nacional de Infectología. 2006. Gastroenteritis por rotavirus y su prevención. *Arch Argent Pediatr* 2006; 104(6):554-559
27. Contin R, Arnoldi F, Mano M, Burrone OR. 2011. Rotavirus replication requires a functional proteasome for effective assembly of viroplasm. *Journal of Virology*. 85(6):2781-2792.
28. Contreras JF, Menchaca GE, Padilla-Noriega L, Tamez RS, Greenberg H, Lopez S, Arias CF. 1995. Heterogeneity of VP4 neutralization epitopes among serotype P1A human rotavirus strains. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2(4):506-508.
29. Dector MA, Romero P, Lopez S, Arias CF. 2002. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep* 3:1175–1180.
30. Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Mehrotra BN. 1973. Screening of Indian Plants for biological activity, Part IV. *Indian Journal Experimental Biology*. 11:43-54.

31. Dimayuga RE, Murillo RF, Pantoja ML. 1987. Traditional medicine of Baja California Sur (México) II. *Journal of Ethnopharmacology*. 20:209-222.
32. Eichwald C, Arnoldi F, Laimbacher AS, Schraner EM, Fraefel C, Wild P, *et al.* 2012. Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLOS One*. 7(10):e47947.
33. Eichwald C, Rodríguez JF, Burrone OR. 2004. Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *Journal of general Virology*. 85:625-634.
34. Estes MK, Kapikian AZ. 2001. Rotaviruses and their replication, p. 1747–1752. *In* D. M. Knipe *et al.* (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
35. Estes MK, Kapikian AZ. 2007. Rotaviruses, *In* D. M. Knipe *et al.* (ed.), *Fields virology*, 5th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. p. 1917–1974.
36. Feng N, Sen A, Wolf M, Vo P, Hoshino Y, Greenberg HB. 2011. Roles of VP4 and NSP1 in determining the distinctive replication capacities of simian rotavirus RRV and bovine rotavirusUK in the mouse biliary tract. *Journal of virology*. 85(6):2686-2694.
37. Fosberg FR, Sachet MH. 1975. *Polynesian Plant Studies*. Smithsonian Institution Press, Washington 1-5.
38. Freshney, R. Ian. 2010. *Culture of animal cells*. Sexta edición. Editorial Alan L. Liss, Inc., New York. P-117
39. Gray J, Iturriza-Gómara M. 2011. Rotaviruses. Enteric Virus Unit, Virus Reference Department, Centre for Infections, Health Protection Agency, London, UK. *Methods Molecular Biology*. 665:325-55.
40. Hamidu LJ, Ayo JO, Adelaiye AB, Abubakar MS. 2008. Sedative and anticonvulsant effects of ethyl acetate fraction of *Waltheria indica* in mice. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 3:261-266.
41. Hardy ME, Hendricks JM, Paulson JM, Faunce NR. 2012. 18B-glycyrrhetic acid inhibits rotavirus replication in culture. *Virology Journal*. 96(9).

42. Heike V. 2010. Sterculiaceae, *Waltheria indica* L. = *W. americana* Malezas de México. Disponible online: [<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/sterculiaceae/waltheria-indica/fichas/ficha.htm>]
43. Hyung-Jun K, Ha-Hyung K, Young Bae R, Jang Hoon K, *et al.* 2010. In vitro anti-rotavirus activity of polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 7668-7674. Published by ELSEVIER Ltd.
44. Infante-Ramírez R, Gough M, Torres RB, Contreras JF, *et al.* 2007. Rotavirus y vacunas. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. México.
http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2008/05/12/rotavirus.pdf
45. Isa P, Realpe M, Romero P, Lopez S, Arias CF. 2004. *Virology*. 322, 370-381
46. Jaramillo AJ. 2005. Historia y filosofía de la medicina. 1º edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 408 p.
47. Jassim SAA, Naji MA. 2003. Novel antiviral agents: a medical plant perspective. Abu Dhabi, UAE. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 412–427
48. Kerharo J, Adam JG. 1974. *La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle. Plantes Médicinales et Toxiques*. Vigot et Frères, Paris.
49. Kerharo J, Bouquet A. 1950. *Plantes Médicinales et Toxiques de la Côte d'Ivoire Haute-Volta*. Vigot et Frères, Paris.
50. Kim H-H, Kwon H-J, Ryu YB, Chang JS, Cho K-O, *et al.* 2012. Antiviral activity of *Alpinia katsumadai* extracts against rotaviruses. *Research in veterinary science*. 92:320-323.
51. Kumar D, Kumar A, Prakash O. 2012. Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology*. 140:1-32.
52. Leonard DB. 2010. *Medicine at your feet: Healing plants of the Hawaiian kingdom*. 1. Roast Duck Productions, US.
53. Lipson SM, Ozen FS, Karthikeyan L, Bulut O, Hyka X, *et al.* 2013. Flavonoid-associated direct loss of rotavirus antigen/antigen activity in cell-free suspension. *Journal of Medicinally Active Plus*. 2(1):10-24.

54. Lopez S, Arias CF. 2004. Trends in Microbiology. 12, 271-278
55. Loustalot AJ, Pagan C. 1949. Local “fever” plants tested for presence of alkaloids. El Crisol Puerto Rico. 3:3-5.
56. Ludert JE, Ruiz MC, Hidalgo C, Liprandi F. 2002. Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsulation. Journal of Virology. 76(13):6643-6651.
57. Madhi SA, Cunliffe NA, Steele D, Witte D, Kirsten M, *et al.* 2010. Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African Infants. N Engl J Med. 362:289-298.
58. Maheswara M, Rao KY, Ra VM, Rao CV. 2006. Antibacterial activity of acylated flavonol glycoside from *Waltheria indica*. Asian Journal of Chemistry. 18, 2761–2765.
59. Maregesi SM, Ngassapa OD, Pieters L, Vlietinck AJ. 2007. Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: Plants used to treat infectious diseases. 113:457-470.
60. Maregesi SM, Pieters L, Ngassapa OD, Apers S, *et al.*, 2008. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. Journal of Ethnopharmacology. 119:58-66.
61. Marshal GS. 2009. Rotavirus Disease and Prevention Trough Vaccination The Pediatric Infectious Disease Journal. Volume 28, Number 4, April 2009.
62. Mathabe MC, Nikolova RV, Lall N, Nyazema NZ. 2006. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. Journal of Ethnopharmacology. 105:286-293.
63. Matsuse IT, Lim YA, Hattori M, Correa M, Gupta MP. 1999. A search for antiviral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. Journal of Ethnopharmacology. 64:15-22.
64. Menchaca G, Padilla-Noriega L, Méndez-Toss M, Contreras JF, Puerto FI, Guiscafré H, *et al.* 1998. Serotype specificity of the neutralizing-antibody response induced by the individual Surface proteins of rotavirus in natural infections of young children. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5(3):328.

65. Meneses LR. 2007. Actividad de extractos naturales sobre la replicación *in vitro* del virus de la fiebre amarilla. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Salud, Bucaramanga.
66. Mohammed Z, Shok M, Ilyas N, Musa KY, Yaro AH. 2007. Analgesic activity of *Waltheria indica* Linn. European Journal of Science Research. 5:4287-4297.
67. Mongalo NI, Opoku AR, Zobolo AM. 2013. Antibacterial and antioxidant activity of extracts from *Waltheria indica* L. University of Zululand. Doi: 10.1016/j.sajb.2013.02.032.
68. Montanha JA, *et al.* 2004. Antiviral Activity of Brazilian Plant Extracts. Porto Alegre, Brasil. *Acta farmacéutica bonaerense* - vol. 23 n° 2
69. Muller H, Johne R. 2007. Rotaviruses: diversity and zoonotic potential — a brief review. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120(3-4):108-112.
70. Nejmeddine M, Trugnan G, Sapin C, Kohli E, Svensson L, Lopez S, Cohen J. 2000. Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells. *J Virol* 74:3313–3320.
71. Offit PA, Clark HR, Stroop WG, Twist EM, Plotkin SA. 1983. The cultivation of human rotavirus, strain ‘Wa’, to high titer in cell culture and characterization of the viral structural polypeptides. *J. Virol. Methods* 7: 29–40.
72. Okatami PM. 2007. Mecanismos de acción de compuestos antivirales aislados en plantas: el Virus de la Inmunodeficiencia Humana como modelo. Facultad de Medicina – Universidad Central de Venezuela. No. 3. ISSN 1317-987X.
73. Olajuyigbe O, Babalola AE, Afolayan AJ. 2011. Antibacterial and phytochemical screening of crude ethanolic extracts of *Waltheria indica* Linn. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(22), pp. 3760-3764. Disponible_online: [<http://www.academicjournals.org/AJMR>] ISSN 1996-0808 ©2011 Academic Journals
74. Organización Mundial de la Salud. 2011. Weekly epidemiological record: Rotavirus vaccine and intussusception: report from an expert consultation. Vol.86 (30): 317-324. Disponible_online: [<http://www.who.int/wer/2011/wer8630.pdf>]

75. Organización Panamericana de la Salud. 2010. Alerta epidemiológica: Actualización, diarreas por rotavirus. Disponible_online: [http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2010/alertas_epi_2010_07_abril_rotavirus_GUT.pdf]
76. Parashar UD, Gibson CJ, Breese JS, Glass RI. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12:304-306.
77. Patton JT, *et al.* 2007. *Adv. Virus Res.* 69,167-201
78. Patton JT. 2012. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discovery Medicine*. Laboratory of infectious diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National institutes of Health. Maryland, US. [Online]. Disponible_online:[<http://www.discoverymedicine.com/John-T-Patton/2012/01/26/rotavirus-diversity-and-evolution-in-the-post-vaccine-world/>]
79. Payment P, Trudel M. 1985. Immunoperoxidase method with human immune serum globulin for broad-spectrum detection of cultivable human enteric viruses: application to enumeration of cultivable viruses in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(5):1308.
80. Payne DC, Wikswo M, Parashar D. 2011. Direct and indirect effects of rotavirus vaccination upon childhood hospitalizations in 3 US counties, 2006-2009. *Clinical Infectious Diseases*.
81. Perez SI, O’Ryan M, Sáez-Llorens X, Linhares CA, *et al.* 2012. Review: Clinical development, registration, and introduction of human rotavirus vaccine: The Latin American experience. *Trials in vaccinology* 1:10-20. ELSEVIER. doi:10.1016/j.trivac.2012.01.001
82. Petrus AJ. 1990. Polyphenolic Components of *Waltheria indica*. *Fitoterapia*. 61, 371.
83. Rao YK, Fang S-H, Tzeng Y-M. 2005. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF α and IL-12 inactivated macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 28:912–915.
84. Rocha-Peña MA, Padrón-Chávez JE. 2009. El cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León. Libro científico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones

Forestales Agrícolas y Pecuarias. CIRNE. Campo experimental General Terán. México.

85. Rojas HNM, Avellaneda SS, Cuéllar CA. 2010. Plantas empleadas en medicina tradicional en Tierra Caliente, Guerrero, México, para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Revista colombiana ciencia animal*. 2:124-136.
86. Rojas M, Ayala-Breton C, López S. 2008. Biología molecular de rotavirus: una mirada a través de la interferencia de RNA. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXII. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.
87. Roner MR, Tam KI, Kiesling-Barrager M. 2010. Prevention of rotavirus infections *in vitro* with aqueous extracts of *Quillaja Saponaria* Molina. *Future Med Chem*. 2(7): 1083-1097. doi: 10.4155/fmc.10.206.
88. Ruiz MC, Leon T, Díaz Y, Michelangeli F. 2009. Molecular biology of rotavirus entry and replication. *The scientific world journal*. 9:1476-1497.
89. Santos N, Hoshino Y. 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 15(1):29-56.
90. Sapin C, Colard O, Delmas O, Tessier C, Breton M, Enouf V, *et al.* 2002. Rafts promote assembly and atypical targeting of a nonenveloped virus, rotavirus, in Caco-2 cells. *J Virol* 76:4591-4602.
91. Saunders JG. 2007. Sterculiaceae of Paraguay. II. *Waltheria*. *Bonplandia*. 16:143-180.
92. Saunders JG. 2011. Resurrection of the Maui endemic *Waltheria pyrolifolia* (Sterculiaceae, Hermannieae). *Darwiniana*. 49:76-85.
93. Savi LA, Caon T, Oliveira AP, Sobottka AM, *et al.* 2010. Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. *Fitoterapia*. 81:1142-1146.
94. Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. 2011. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *The EMBO Journal*. 30, 408-416/European Molecular Biology Organization.

95. Shai LJ, Masoko P, Makgotho MP, Magano SR, *et al.*, 2010. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. *South African Journal of Botany*. 76:465-470.
96. Shaneyfelt ME, Burke AD, Graff JW, Jutila MA, Hardy ME. 2006. Natural products that reduce rotavirus infectivity indentified by a cell-based moderate-throughput screening assay. *Bio Med Central. Virology Journal*, 3:68: 10.1186/1743-422X-3-
97. Silvestri LS, Taraporewala ZF, Patton JT. 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J. Virol.* 78, 7763-7774
98. Suzuki H, Kutsuzawa T, Konno T, Ebina T, Ishida N. 1981. Morphogenesis of human rotavirus type 2 Wa strain in MA 104 cells. *Arch Virol.* 70:33-41.
99. Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniguchi K, *et al.* 2001. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Research* 49; 15:24
100. Tam KI. 2010. Characterization of anti-rotavirus activities of saponin extracts from *Quillaja saponaria*. The University of Texas at Arlington. Thesis Degree of doctor.
101. Tapsoba H, Deschamps JP. Use of medicinal plants for the treatment of oral diseases in Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology*. 104:68-78.
102. Taraporewala ZF, Patton JT. 2001. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *Journal of Virology*. 75:4519-4527.
103. Tate JE, Steele AD, Bines JE, Zuber PL, Parashar UD. 2012. Research priorities regarding rotavirus vaccine and intussusception: A meeting summary. *Vaccine* 30S A179-A184. Published by ELSEVIER Ltd.
104. Velásquez FR, García LH, Rodríguez E, Cervantes Y, *et al.* 2004. Diarrhea morbidity and mortality in Mexican children impact of rotavirus disease. *Pediatr Infec Dis J.* 23:S149-S155.

105. Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. 1984. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*. 19(6):784-753.
106. Weber B, Harms F, Selb B, Doerr HW. 1992. Improvement of rotavirus isolation in cell culture by immune peroxidase staining. *Journal of Virological Methods*. 38:187-194.
107. WHO. 2009. Rotavirus vaccines: an update. World Health Organization, *Weekly Epidemiological Record* 84:533-540.
108. Zailani AH, Jada SM, Wurochekke UA. 2010. Antimicrobial activity of *Waltheria indica*. *Journal of American Science*. 6:1591-1594.
109. Zavala MA, Pérez S, Pérez C, Vargas R, Pérez RM. Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. *Journal of Ethnopharmacology*. 61:41-47.
110. Zentner B-S, Margalith M, Galil A, Halevy B, Sarov I. 1985. Detection of rotavirus-specific IgG antibodies by immunoperoxidase assay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Virological Methods*. 11:199-206.
111. Zongo F, Ribout C, Boumendjel A, Guissou I. 2013. Bioguidage search of active compounds from *Waltheria indica* L. (Malvaceae) used for asthma and inflammation treatment in Burkina Faso. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. Doi: 10.1111/fcp.12037
112. Zongo F, Ribout C, Boumendjel A, Guissou I. 2013. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (*syn. Waltheria americana*): A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 148:14-26.

APÉNDICE I: PROTOCOLOS

Protocolo descongelación celular

1. Limpiar adecuadamente la campana de flujo laminar con SDS 1% y etanol 70%.
2. Mantener agua a 37°C para utilizarlo como baño María
3. Elegir el criotubo a descongelar en el tanque de Nitrógeno líquido e introducir inmediatamente en el baño María durante 5 minutos.
4. Una vez descongelado el criotubo, se desinfecta con etanol 70% y se introduce en la campana de flujo laminar.
5. En dos viales de 25 cm² adicionar 4.5 ml de medio D-MEM suplementado con suero fetal de bovino 3%.

Nota: El medio de cultivo se almacena a 4°C, por lo tanto, debe estar debidamente atemperado antes de su uso.

6. Tomar 500 µl de células y depositar en cada vial y homogenizar perfectamente.
7. Incubar a 37°C en incubadora con 5% de CO₂ en un periodo de 5 horas.
8. Reemplazar el medio de cultivo con un volumen igual de medio fresco e incubar nuevamente hasta confluencia.

Nota: Las células que se descongelan poseen DMSO (sustancia crio-protectora). Sin embargo, una vez sembradas las células, esta sustancia debe ser retirada debido a que resulta tóxico para las células.

9. Monitorear de 24 a 48 horas el desarrollo de la monocapa observando en el microscopio invertido a 4X.

Protocolo congelación de líneas celulares

1. A partir de un vial (25-75 cm²) con células confluentes, retirar el medio de cultivo utilizando una bomba de vacío.
2. Realizar un lavado con EDTA 0.68 mM (agregar 2 ml para un vial de 25 cm² y 4 ml para un vial de 75 cm²).
3. Retirar el buffer y agregar Tripsina 0.25% para disgregar la monocapa celular (500 µl para un vial de 25 cm² y 1 ml para un vial de 75 cm²).
4. Dejar actuar un máximo de 5 minutos e inactivar agregando D-MEM con SFB 3% (2 ml para un vial de 25 cm² y 4 ml para un vial de 75 cm²).
5. Alicuotar la suspensión celular en tubos de centrifuga 1.5 ml y centrifugar 2 minutos a 1200 rpm.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet con 1 ml de medio de congelamiento (10% DMSO, 20% SFB y 70% D-MEM).
7. Transferir las resuspensiones a criotubos debidamente identificados:
 - Línea celular
 - Número de pase
 - Fecha de congelación
 - Tipo de crio-preservador
8. Almacenar a -70°C durante 24 horas y de forma vertical en un contenedor cubierto con algodón.
9. Introducir en Nitrógeno líquido y registrarlos en el inventario.
10. Almacenar hasta su uso (revisar Protocolo I).

Inoculación de células MA 104 en placa de 96 pozos

1. A partir de un cultivo celular confluyente, disgregar las células agregando Tripsina 0.25% y homogenizar con 2.5 ml de D-MEM suplementado con suero fetal bovino 3%.
2. En una placa Petri, agregar 20 ml de medio de cultivo y mezclar con 800 μ l de la suspensión celular.
3. En una placa de 96 pozos estéril se vierten 200 μ l a cada pozo (aproximadamente 20 000 células por pozo). Utilizar una pipeta multicanal para este paso.
4. Homogenizar la placa de 96 pozos con movimientos suaves e incubar la placa por aproximadamente 72 horas.

Protocolo obtención de lisados a diferentes tiempos post-infección con rotavirus Wa y DS-1 pre-tratados con extracto hidroalcohólico de *W. americana* 1:500 (0.2 mg/ml)

1. Activar los lisados de Wa y DS-1 con 1 ul de Tripsina 0.1% durante 30 minutos a 37°C.

Nota: La cantidad de lisado que se debe activar se calcula en base a la concentración determinada del lisado mediante titulación de focos infecciosos y la cantidad de células disponibles a infectar, de tal manera que se agreguen 0.1 unidades virales por célula (MI 0.1).

2. Diluir 20 ul del extracto hidroalcohólico en 10 ml de medio MEM sin suero. La concentración stock de nuestro extracto es 100 mg/ml.

3. Terminado el tiempo de incubación de los lisados se mezclan los lisados activados con el extracto diluido 1:500 (relación 1:1 v/v).

4. Incubar esta mezcla durante una hora a 37°C.

5. Lavar por duplicado solamente tres de los 6 pozos de la placa subcultivada con buffer PBS A 1x. Designar e identificar por la parte de arriba de la placa un pozo para MOCK, uno para extraer a las 4 horas y otro a las 8 horas post-incubación.

6. Después del lavado, depositar la mezcla lisado-extracto a cada pozo (si la cantidad de lisado activado fue 500 ul se deberán agregar 1 ml de mezcla virus-extracto en el pozo), en el pozo destinado como MOCK se agrega una misma cantidad de la dilución de extracto 1:500 sin virus.

7. Incubar la placa a 37°C durante 1 hora.

8. Lavar con 1 ml de PBS A 1x los pozos infectados una sola vez y posteriormente depositar 2.5 ml de MEM sin suero a cada pozo.

9. Incubar a 37°C durante 4 y 8 horas.

10. Una vez cumplidos esos tiempos se rasparán con una punta de micropipeta la monocapa del pozo correspondientes y se dispensan en tubos de centrifuga para posteriormente almacenarse a -20°C hasta su uso.

Extracción de RNA con Trizol (Tri-Reagent)

1. Realizar una suspensión de lisado (300 μ l) en un tubo de centrifuga de 1.5 ml.
2. Adicionar 500 μ l de Trizol (Tri-Reagent).
3. Agitar un instante (3 segundos en vortex con pausas de 2 segundos entre cada agitación, repetir 10 veces).
4. Incubar los tubos en hielo durante 5 minutos.
5. Adicionar 100 μ l de Cloroformo a cada tubo.
6. Repetir el paso 3.
7. Incubar en hielo por 3 minutos.
8. Centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos.
9. Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo de centrifuga debidamente etiquetado.
10. Adicionar a la fase acuosa 400 μ l de Isopropanol y mezclar por inversión 5 veces.
11. Almacenar a -20°C toda la noche.
12. Repetir el paso 8.
13. Retirar el alcohol isopropílico dejando 50 μ l aproximadamente. Es importante mantener todas las condiciones a 4°C.
14. Adicionar 1 ml de etanol absoluto (-20°C) y mezclar por inversión 5 veces.
15. Centrifugar a 12000 rpm durante 7 minutos a 4°C.
16. Retirar todo el alcohol y dejar pellet translúcido.
17. Adicionar 1 ml de etanol 75% (-20°C) y mezclar por inversión 5 veces.
18. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
19. Retirar todo el alcohol y dejar los tubos abiertos dentro de una campana de flujo laminar por un periodo de 10-15 minutos.
20. Resuspender la pastilla de RNA en 20 μ l de agua miliQ y dejar reposar por 10 minutos.
21. Almacenar a -20°C hasta su uso.

Tinción con plata (para muestras de RNA)

1. Después de desensamblar la cámara de electroforesis, el gel de poliacrilamida se sumerge en 100 ml de solución fijadora (Etanol 10%, Ácido acético 0.5% y Agua bidestilada 89.5%). El gel puede permanecer desde 30 minutos hasta 24 horas en la solución.
2. Sumergir el gel en 100 ml de Nitrato de Plata 1x durante 30 minutos en ausencia de luz.
3. Realizar lavados breves con agua bidestilada para eliminar el exceso de la solución anterior.
4. Sumergir el gel en 100 ml de solución reveladora (Formaldehído-NaOH 10 M).
5. Agitar suavemente y dejar la reacción hasta observar las bandas de RNA de la muestra control.
6. Retirar la solución reveladora y agregar 100 ml de solución aclaradora (Ácido acético 5%).
7. Una vez obtenido el contraste deseado, lavar el gel brevemente con agua bidestilada.

Tinción con plata (proteínas)

1. Introducir el gel en 100 ml de solución fijadora (Ácido acético 5%-Metanol 50%) durante 30 minutos.
2. Lavar el gel 15 minutos en una solución de Metanol 50% y 15 minutos en agua miliQ.
3. Sensibilizar el gel con una solución de Tiosulfato de sodio al 0.01% durante un minuto.
4. Realizar dos lavados de un minuto con agua miliQ.
5. Teñir el gel con Nitrato de Plata 0.1% durante 20 minutos a 4°C.
6. Repetir el paso 4.
7. Revelar con una solución de Carbonato de sodio 2% diluido en formalina 0.04%. Incubar a temperatura ambiente 30 minutos con agitaciones suaves, o bien, hasta visualizar las bandas proteicas.
8. Lavar brevemente con agua bidestilada y conservar el gel.

Protocolo de purificación con kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA)

1. Realizar una reacción de RT-PCR para amplificar el gen 8 de rotavirus.
2. Correr una electroforesis en agarosa Low Melting 1.2% durante una hora a 100 V constantes.
3. Teñir el gel con Bromuro de Etidio durante 15 minutos y observar en el transiluminador de luz UV para ubicar las bandas.
4. Hacer un corte rápido en el gel donde migraron las bandas e introducir en tubos de centrifuga.
5. Calcular el peso de los fragmentos de agarosa obtenidos y añadir 10 µl de Solución Membrane Binding por cada 10 mg de peso registrado.
6. Agitar un instante en vortex e introducir los tubos en baño María (55-60°C) por 10 minutos. Agitar un instante los tubos en vortex cada 2 minutos hasta completar el tiempo determinado.
7. Una vez fundido el gel de agarosa, pasar el volumen de un tubo a una columna de purificación SV (800 µl volumen máximo).
8. Incubar a temperatura ambiente durante un minuto y posteriormente centrifugar un minuto a 14000 rpm.
9. Retirar el sobrenadante y añadir 700 µl de solución Wash a la columna de purificación.
10. Centrifugar a 14000 rpm durante un minuto.
11. Retirar el sobrenadante y añadir 500 µl de solución Wash a la columna de purificación.
12. Centrifugar a 14000 rpm durante por 8 minutos.
13. Transferir la columna de purificación a un tubo de centrifuga y añadirle 25 µl de agua miliQ.
14. Incubar un minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
15. Correr una electroforesis en gel de agarosa 1.5% para comprobar que se purificó el fragmento que se desea clonar.

Protocolo de purificación con kit Wizard[®] Plus SV miniprepsDNA purification system (PROMEGA)

1. Tomar en condiciones de esterilidad 2 ml de cultivo de bacterias transformadas y dispensar en alícuotas de 1 ml en dos tubos de centrifuga.
2. Centrifugar a 8000 rpm durante 5 minutos.
3. Decantar el medio de cultivo y resuspender el pellet con 250 µl solución para resuspender células (etiqueta roja). Utilizar un solo volumen para resuspender el pellet de los dos tubos y lograr mayor concentración de bacterias.
4. Añadir 250 de solución lisis (etiqueta verde). Mezclar por inversión suave 4 veces.
5. Agregar 10 µl de proteasa alcalina (tapa celeste). Mezclar por inversión suave 4 veces.
6. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Añadir 350 µl de solución neutralizante (etiqueta azul). Mezclar por inversión 4 veces.
8. Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos.
9. Transferir el sobrenadante a una columna SV y centrifugar a 14000 rpm por un minuto.
10. Decantar el sobrenadante y añadir 750 µl de solución Wash.
11. Centrifugar a 14000 rpm durante un minuto.
12. Desechar el sobrenadante y añadir 250 µl de solución Wash.
13. Centrifugar a 14000 rpm durante dos minutos.
14. Quitar la columna SV e introducirla en otro tubo de centrifuga previamente etiquetado.
15. Añadir 50 µl de agua libre de nucleasas.
16. Centrifugar a 14000 rpm durante un minuto.
17. Retirar la columna SV y almacenar el tubo de centrifuga a -20°C.
18. Realizar una electroforesis en gel de agarosa 1% cargando 3 µl de producto purificado y 2 µl de azul de Bromofenol en cada pozo.

Protocolo para realizar bacterias calcio competentes

1. Picar una colonia bacteriana, o bien tomar tres asadas de cultivo *E. coli* (cepas DH5 α o BL21) y sembrarlas en 2 ml de caldo LB.
2. Incubar el cultivo a 37 °C toda la noche con una agitación constante de 200 rpm.
3. Preparar 50 ml de caldo LB enriquecido con MgSO₄ (20 mM) y atemperar a 37 °C antes de usarse.
4. Inocular el caldo anterior con 500 μ l del cultivo incubado toda la noche. De este modo, se obtendrá una dilución bacteriana de 1:100.
5. Incubar a 37 °C con agitación constante a 250 rpm hasta obtener un crecimiento bacteriano óptimo (ajustar el cultivo a densidad óptica entre 0.4-0.6 a 590 nm).
6. El monitoreo de la densidad óptica se puede realizar cada 30 minutos. Generalmente, el cultivo puede demorarse aproximadamente 3 horas.
7. Transferir el cultivo de bacterias a un tubo de centrifuga de 50 ml y centrifugar a 5000 rpm (4 °C) por 5 minutos.
NOTA: Es importante mantener en hielo el cultivo bacteriano durante todo el proceso.
8. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10 ml de buffer de transformación (TFB I) mantenido a 4 °C.
9. Incubar las bacterias en hielo durante 5 minutos y centrifugar la suspensión a 5000 rpm (4 °C) durante 5 minutos.
10. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 ml de TFB II mantenido a 4 °C.
11. Incubar las bacterias 30 minutos en hielo.
12. Preparar alícuotas de 250 μ l en tubos de centrifuga etiquetados y atemperados previamente a 4 °C.
13. Almacenar a -70 °C hasta su uso.

APÉNDICE II: SOLUCIONES DE TRABAJO

Soluciones para cultivo celular, infección y tinción de focos

- **Medio de cultivo para subcultivo celular: D-MEM con SFB 3%**

Advanced DMEM 1X (GIBCO Cat.12491015)	167 ml
Suero Fetal de Bovino (GIBCO Cat. 16000-036)	6 ml
L-Glutamina (GIBCO Cat. 25030-081)	2 ml

Mezclar dentro de una campana de flujo laminar y depositar en un frasco Wheaton de 250 ml estéril.

- **Solución de lavado para subcultivo celular: EDTA 0.68 Mm**

Disolver 30 mg de Ácido etilendiaminotetraacético (Research Organics) en 135 ml de agua bidestilada y adicionar 15 ml de PBS A 10X. Depositar en un frasco Wheaton de 250 ml y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 120°C

- **Buffer de Fosfatos Salino sin Ca y Mg (PBS A) 10X**

Cloruro de Sodio (NaCl)	8 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2 g
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
Fosfato de Sodio anhidro (Na ₂ HPO ₄)	1.15 g

Aforar a 100 ml con agua bidestilada

- **Solución de lavado para infección celular: PBS A 1X**

PBS A 10X 20 ml

Agua bidestilada 180 ml

- **Solución de lavado para infección celular: PBS A 5X**

PBS A 10X 50 ml

Agua bidestilada 50 ml

- **Solución para activar lisados de rotavirus: Tripsina 1%**

A partir de Tripsina 2.5% (GIBCO Cat. 15090-046) diluir con PBS A 1Xy dispensar en alícuotas de 20 µl para evitar la congelación-descongelación. Almacenar las alícuotas a -20°C.

- **Reactivo para disgregación celular: Tripsina 0.25%**

Dispensar directamente el reactivo Tripsina 0.25% (GIBCO Cat. 15050-057) en alícuotas de 0.5 ml para evitar la congelación-descongelación, almacenar a 4°C las alícuotas de uso inmediato y el sobrante se conserva a -20°C.

- **Medio de cultivo para infección viral: MEM con L-Glu y HEPES**

MEM 1X (GIBCO Cat.11090081) 100 ml

L-Glutamina 200 mM 1 ml

HEPES 1M (GIBCO Cat. 15630-080) 1 ml

Mezclar todos los reactivos en condiciones de esterilidad. No se debe esterilizar en autoclave.

- **Solución para fijar células MA104: Acetona 80% - PBS A 5X**

PBS A 5X 20 ml

Acetona ACS 80 ml

Mezclar los reactivos y almacenar en temperatura ambiente.

- **Sustrato carbazol para tinción con inmunoperoxidasa**

Buffer de Acetatos 0.05 M (pH 5) 4 ml

Peróxido de Hidrógeno 30% 10 μ l

Carbazol (4 mg/ml) 1.5 ml

Adicionar los reactivos en el orden indicado y filtrar con 0.45 μ m. Utilizar inmediatamente y desechar la solución sobrante.

- **Carbazole 4 mg/ml**

Carbazol (Sigma-Aldrich Cat. A5754-10G) 120 mg

N,N-Dimetilformamida (Sigma-Aldrich Cat. D4551-250ML) 30 ml

Realizar la mezcla utilizando guantes ya que los reactivos son tóxicos. Proteger de la luz y almacenar a 4°C.

- **Buffer de Acetatos 0.05 M pH 5.0**

Acetato de Sodio (anhidro) 0.2 g

Agua bidestilada 45 ml

Ácido Acético ACS 25 μ l aprox. (ajuste de pH)

Una vez obtenido el pH requerido, aforar la solución a 50 ml. Utilizar inmediatamente y almacenar el sobrante a temperatura ambiente.

Soluciones para electroforesis de RNA

- **Gel de Poliacrilamida 8%**

Poliacrilamida 30% (BioRad) 1.65 ml

Tris-HCl 2M (pH 8.8) 1.02 ml

Agua bidestilada 3.39 ml

(Agitar suavemente para homogenizar)

Persulfato de amonio 10% 120 μ l

TEMED 10 μ l

(Añadir estos dos reactivos simultáneamente y vaciar la mezcla al molde inmediatamente)

- **Tris-HCl 2M (pH 8.8)**

Trisma-base (PM 121.1) 12.1 g

Agua bidestilada 35 ml

(Ajustar a pH 8.8 con ácido clorhídrico y aforar a 50 ml)

- **Buffer Tris-Glicina 10X**

Disolver en 200 ml de agua bidestilada

Glicina 34.6 g

Tris-base 7.2 g

Aforar a 300 ml

- **Buffer Tris-Glicina 1X**

Disolver 30 ml de buffer Tris-Glicina 10X en 270 ml de agua bidestilada.

Soluciones para electroforesis de proteínas y Western blot

- **Gel SDS-poliacrilamida 12%**

FASE 1: RUNNING 12%

Acrilamida-Bis 40% 29:1 (BioBasic) 2 ml

Tris-HCl 1.5M pH 8.8 1.25 ml

SDS 10% 50 μ l

Agua bidestilada 1.82 ml

(Agitar suavemente para homogenizar)

Persulfato de amonio 10% 120 μ l

TEMED 10 μ l

(Añadir estos dos reactivos simultáneamente y vaciar 3 ml de la mezcla al molde. Aplicar agua bidestilada al molde para rellenar el espacio que no fue cubierto con la mezcla)

-Dejar polimerizar 20 minutos aproximadamente

FASE 2: STACKING 4%

Acrilamida-Bis 40% 29:1 (BioBasic) 0.5 ml

Tris-HCl 1M pH 6.8 0.37 ml

SDS 10% 30 μ l

Agua bidestilada 2.02 ml

(Agitar suavemente para homogenizar)

Persulfato de amonio 10% 60 μ l

TEMED 5 μ l

(Añadir estos dos reactivos simultáneamente y vaciar aproximadamente 2 ml de la mezcla al molde). Ajustar el peine separador y dejar polimerizar 20 minutos.

- **Tris-HCl 1.5M (pH 8.8)**

Trisma-base (PM 121.1) 9.08 g

Agua bidestilada 30 ml

(Ajustar a pH 8.8 con ácido clorhídrico y aforar a 50 ml)

- **Tris-HCl 1M (pH 6.8)**

Trisma-base (PM 121.1) 6.05 g

Agua bidestilada 30 ml

(Ajustar a pH 6.8 con ácido clorhídrico y aforar a 50 ml)

- **Buffer SDS-Tris-Glicina 10X**

Disolver en 200 ml de agua bidestilada

Glicina 28.8 g

Tris-base 6 g

SDS (grado molecular) 2 g

- **Buffer SDS-Tris-Glicina 1X**

Disolver 30 ml de buffer Tris-Glicina 10X en 270 ml de agua bidestilada.

- **Azul de Coomassie**

Azul brillante R-250 0.5 g

Metanol 225 ml (Agitar 30 min)

Agua bidestilada 225 ml (Agitar 30 min)

Ácido acético conc. 50 ml (Agitar 30 min)

- **Solución para desteñir el gel**

Metanol 10 ml

Ácido acético 10 ml

Agua bidestilada 80 ml

- **Buffer de transferencia**

Tris-base 3 g

Glicina 14.4 g

Agua bidestilada 800 ml

Metanol 200 ml

- **Buffer TBS-Tween 0.05%**

Tris-base (20 mM) 1.21 g

NaCl (150 mM) 4.38 g

Disolver en 300ml de agua bidestilada

Ajustar pH a 7.5 con ácido clorhídrico

Aforar a 500 ml volumen final

Soluciones para bacterias calcio competentes

- **TFB I (Buffer de transformación)**

Acetato de potasio 30 mM (KOac) 1.47 g

Cloruro de calcio 10 mM (CaCl₂) 0.55 g

Cloruro de Magnesio 50 mM (MnCl) 4.04 g

Cloruro de potasio 100 mM (KCl) 3.73 g

Glicerol 15% 75 ml

Disolver con agua bidestilada a volumen final 500 ml y pH 5.8 con ácido acético

Filtrar con 0.45 micras y almacenar a 4°C

- **TFB II (Buffer de transformación)**

MOPS 10 mM 1.04 g

Cloruro de calcio 75 mM (CaCl₂) 4.16 g

Cloruro de potasio 10 mM (KCl) 0.37 g

Glicerol 15% 75 ml

Disolver con agua bidestilada a volumen final 500 ml. Filtrar con 0.45 micras y almacenar a 4°C

Reactivos para purificación de proteínas

- **Buffer B1 (sin Urea)**

Fosfato de Sodio 20 mM (Na_2HPO_4) 0.28 g

Cloruro de Sodio 500 mM (NaCl) 2.92 g

Imidazol 20 mM 0.31 g

Disolver en agua bidestilada a 100 ml volumen final y ajustar a pH 7.4

- **Buffer B2 (equilibrar la columna de afinidad)**

Fosfato de Sodio 20 mM (Na_2HPO_4) 0.28 g

Cloruro de Sodio 500 mM (NaCl) 2.92 g

Imidazol 20 mM 0.13 g

Urea 4 M 24 g

Disolver en agua bidestilada a 100 ml volumen final y ajustar a pH 7.4

- **Buffer B3 (lavado de columna de afinidad)**

Fosfato de Sodio 20 mM (Na_2HPO_4) 0.28 g

Cloruro de Sodio 500 mM (NaCl) 2.92 g

Imidazol 100 mM 0.66 g

Urea 4 M 24 g

Disolver en agua bidestilada a 100 ml volumen final y ajustar a pH 7.4

- **Buffer B4 (elución)**

Fosfato de Sodio 20 mM (Na_2HPO_4) 0.28 g

Cloruro de Sodio 500 mM (NaCl) 2.92 g

Imidazol 300 mM 2.04 g

Urea 4 M 24 g

Disolver en agua bidestilada a 100 ml volumen final y ajustar a pH 7.4

RESÚMEN BIOGRÁFICO

Verónica Lisset Loaiza Gutiérrez

Candidata para el grado de
Maestro en Ciencias con acentuación en Microbiología

TESIS: ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIVIRAL DE *Waltheria americana* L
(Standley y Steyermark, 1949) EN EL PROCESO INFECTIVO DE
ROTAVIRUS HUMANO SOBRE CÉLULAS MA 104

Campo de Estudio: Virología, Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Guadalupe, Nuevo León el 6 de Abril de 1989, hija de
Fernando Loaiza Soberanes y Rosario Gutiérrez Rojo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el 2011 con mención honorífica,
por su defensa de tesis.

Experiencia Profesional: Becaria y servicio social en laboratorio de Microbiología
General de la Facultad de Ciencias Biológicas desde el 2009.
Prácticas profesionales externas en formulaciones de productos
industriales hasta el 2012.