

**Evaluación de efecto de la curcumina en la infección por virus dengue en un modelo celular *in vitro*.**

Por:

Leonardo Padilla Sanabria.

Director:

Jhon Carlos Castaño Osorio. PhD.

Comité tutorial.

Dra. Patricia Landazuri. PhD.

Dr. Juan Carlos Gallego. PhD.

TESIS DOCTORAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

Noviembre de 2013

## **Dedicatoria.**

En el camino de mi vida, Dios me ha permitido conocer personas valiosas que me han colaborado en mi crecimiento espiritual, personal y profesional, para poder cumplir mis sueños y metas. A todas estas personas quiero dedicar este trabajo.

## **Agradecimientos**

A Dios Padre Hijo y Espíritu Santo, en quien creó y confío.

A mis padres Luis Alfredo y Flor María, quienes me dieron la vida y me enseñaron a ser persona.

A mi Esposa María Cristina y a mis Hijos José Luis y María Camila, quienes son el mayor motor de mi vida para seguir adelante, además, de ser mi alegría y mi esperanza.

A todos mis profesores, con especial afecto por el Dr Jhon Carlos castaño quien ha introducido en el mundo de la ciencia y me ha guiado en este camino.

A todos mis compañeros y amigos, quienes con su colaboración me han ayudado a que este trabajo llegue a buen término.

## Tabla de contenido.

I. Introducción.....	página 7.
II. Antecedentes.....	página 8.
Curcumina y virus.....	página 8.
Curcumina y alteración del sistema ubiquitina proteosoma.....	página 8.
Citoesqueleto y virus.....	página 9.
Curcumina y citoesqueleto.....	página 9.
Curcumina y apoptosis.....	página 10.
III. Marco Teórico.....	página 11.
Dengue.....	página 11.
Curcuma longa y curcumina.....	página 12.
Ubiquitina.....	página 13.
Proteosoma.....	página 13.
Citoesqueleto.....	página 14.
Apoptosis.....	página 14.
Retículo endoplasmático y estrés.....	página 15.
IV. Objetivos.....	página 16.
V. Metodología.....	página 17.
1. Metodología general.....	página 17.
2. Metodología específica.....	página 19.
VI. Resultados.....	página 25.
VII. Discusión.....	página 56.
VIII. Conclusiones.....	página 64.
VIII. Bibliografía.....	página 65.

## Lista de figuras.

Figura 1: Determinación de la Viabilidad celular por el método de tripan azul en células BHK-21. ....página 25.

Figura 2 Determinación de la Viabilidad celular por el método de alamar blue en células BHK-21.....página 25.

Figura 3a: Determinación del Porcentaje de viabilidad de las células BHK-21 tratadas con diferentes concentraciones de curcumina y MG132, por el método de MTT.....página 26.

Figura 3b: Determinación del Porcentaje de viabilidad de células Vero tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, por el método de MTT. ....página 27.

Figura 3c. Determinación del Porcentaje de viabilidad de las células Vero tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de curcumina y medido por 96 horas. ....página 28.

Figura 3d. Determinación del Porcentaje de viabilidad de células Vero tratadas con Nocodazole, Paclitaxel, Phalloidin, Lantrunculin, por el método de MTT.....página 29.

Figura 4. Recuento de unidades formadoras de placa de los sobrenadantes de cultivos infectados con DENV-2 a una MOI 1 y tratados con diferentes concentraciones de curcumina.....página 30.

Figura 5. Recuento de las unidades formadoras de placa de los sobrenadantes de cultivos infectados con DENV-2 a una MOI 5 y tratados con diferentes concentraciones de curcumina.....página 31.

Figura 6. Grafica generada por el programa Statgraphic Centurion XV. Versión II, después de realizar un ANOVA de única vía a los datos obtenidos, del logaritmo (Log) del recuento de las PFUs en las células infectadas con DENV-2 a una MOI de 5 y tratadas con curcumina o DMSO.....página 32.

Figura 7. Cuantificación relativa de la proteína del DENV-2, por el método de In cell western.....página 32.

Figura 8. Representación gráfica del recuento del logaritmo ( $\text{Log}^{10}$ ) de las PFUs de los sobrenadantes de cultivos infectados con DENV-2 a una MOI 5 por 72 h. después del tratamiento con curcumina por 24 h.....página 33.

Figura 9. Representación gráfica del recuento del logaritmo ( $\text{Log}^{10}$ ) de las PFUs de los sobrenadantes de cultivos infectados con DENV-2 a una MOI 5 por 72 h. después del tratamiento previo a la infección con curcumina por 4h.....	Página 34.
Figura 10. Cuantificación del RNA del DENV-2 a partir de células infectadas .....	Página 35.
Figura 11a. Western blot, para determinar la presencia de proteínas marcadas con ubiquitina, en células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina. ....	página 35.
Figura 11b. Western blot para determinar la presencia de ubiquitina libre En células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.....	página 36.
Figura 11c. Western blot, para determinar la presencia de proteínas marcadas con ubiquitina Lys-48, en células infectas con DENV-2 y sin infección, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.....	página 36.
Figura 11d. Cuantificación relativa de las proteínas marcadas con ubiquitina Lys-48 en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.....	página 37.
Figura 12. Inhibición en la producción de PFUs en células BHK-21 tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de proteosoma MG132.....	página 38.
Figura 13a. Evaluación del efecto del curcumina sobre el citoesqueleto de actina en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina por 12 horas.....	página 39.
Figura 13b. Evaluación del efecto del curcumina sobre los microtúbulos, en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina por 24 horas.....	página 40.
Figura 13c. Evaluación del efecto de la curcumina sobre los filamentos intermedios en las células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con curcumina a diferentes concentraciones por 24 horas.....	página 41.
Figura 13d. Alteración en el citoesqueleto de actina en las células BHK-21 infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con curcumina a diferentes concentraciones por 24 horas.....	página 42.
Figura 13e. Células Vero sin infectar, tratadas diferentes concentraciones de curcumina marcadas con actina.....	página 43.

Figura 13eII, células Vero infectadas y tratadas diferentes concentraciones de curcumina, marcadas con actina.....página 44.

Figura 13f. Alteración del citoesqueleto en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con 15  $\mu$ M de curcumina y marcadas con actina, microtúbulos y filamentos intermedios.....página 45.

Figura 13g. Cambios morfológicos generados por el tratamiento con: Nocodazole, Latrunculin, Paclitaxel, Phalloidin, en las células BHK-21.....página 46.

Figura 13h. Comparación en la alteración del citoesqueleto de actina después de realizar el tratamiento con curcumina y Latrunculin en células Vero y BHK-21. ....página 47.

Figura 13i. Grafica generada por el programa Statgraphic Centurion XV. Versión II®. después de realizar un ANOVA de única vía de los diferentes tratamientos con Nocodazole, Latrunculin, Paclitaxel, Phalloidin.....página 48.

Figura 14a. Evaluación de la retención de la curcumina en células Vero, glóbulos rojos y membranas de glóbulos rojos.....página 49.

Figura 14b. Determinación de la retención de la curcumina a nivel del retículo endoplasmático.....página 50.

Figura 15. Cuantificación relativa de las proteína ATF-6, PERK, pPERK e IRE, por el método de In cell western, en células Vero.....página 51.

Figura 16a. Representación gráfica del porcentaje de células marcadas con anexina V en las células infectados y sin infección con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.....página 52.

Figura 16b. Grafica de interacción generada por el programa Statgraphic Centurion XV. Versión II, después de realizar un ANOVA de doble vía al porcentaje de células que presentan marcaje con anexina V en las células infectadas y sin infectar con DENV-2.....página 53.

Figura 16c. Cuantificación relativa de caspasa 3 activa en células Vero.....página 54.

Figura 16d. Células Vero transfectadas con marcaje para mitocondria tratadas con diferentes concentraciones de curcumina por 24 h.....página 55.

## I. INTRODUCCIÓN

La curcumina es una sustancia de color amarillo (diferuloymethano) que se extrae a partir de los rizomas de la *Cúrcuma longa*<sup>1,2</sup>, la cual se ha utilizado tradicionalmente en la cultura oriental para el tratamiento de muchas enfermedades; actualmente se han publicado resultados de varias investigaciones donde se evidencia su actividad antitumoral, inmunomoduladora, antioxidante, antiinflamatoria, antifúngica y antiviral entre otras<sup>3-8</sup>. Respecto a la actividad antiviral, se ha observado que los extractos de cúrcuma y la curcumina posee capacidad de alterar la infección de diferentes virus entre los que se encuentran: Epstein Barr, HIV, Coxsackie, hepatitis B, encefalitis japonesa, influenza entre otros<sup>9-17</sup>.

El dengue es una enfermedad re-emergente de distribución mundial en los países tropicales y subtropicales, se estima que de los 2500 millones de personas que viven en áreas en riesgo de transmisión, 50 millones se infectan anualmente y más de 500.000 contraen sus formas graves. Durante las epidemias, las tasas de ataque pueden llegar a afectar a 80–90% de las personas susceptibles y la letalidad puede ser mayor de 5%.<sup>18,19</sup>, el agente causal pertenece a la familia flaviviridae, genero flavivirus, posee cuatro serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4,<sup>20,21</sup> la infección causada por cualquiera de estos serotipos del virus, puede cursar en forma asintomática, producir el cuadro clásico de la enfermedad (Dengue sin signos de alarma) o el cuadro grave (Dengue severo, con signos de alarma), caracterizado por extravasación de plasma, hemorragias severas o afectación de órganos.<sup>22</sup>

Actualmente, no existe una vacuna aprobada para la aplicación en humanos y no existe tratamiento farmacológico específico para esta enfermedad.

La necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas frente al dengue, nos han llevado a realizar esta investigación, la cual produjo nuevo conocimiento respecto al efecto de la curcumina sobre la infección por virus dengue en cultivo celular in-vitro.

## II. ANTECEDENTES.

**Curcumina y Virus:** La *Cúrcuma longa*, es una planta originaria de la india y la china, de la cual se extrae un colorante amarillo que está compuesto por curcumina (77%), demetoxicurcumina (17%), bisdemetoxicurcumina (3%), la curcumina es el mayor componente de la cúrcuma y ha esta molécula se la ha reportado actividad antiviral en diferentes virus; respecto al HIV se ha evidenciado que la curcumina inhibe la integrasa viral y se ha postulado la curcumina como un nueva molécula promisoría para el tratamiento de los pacientes infectados con este virus, además a través de estudios in silico se ha evidenciado que la curcumina podría acoplarse de forma eficiente con la retrotranscriptasa viral<sup>9,10</sup>; frente al virus de la hepatitis B se reportó que el extracto obtenido a partir de la *Cúrcuma longa* disminuyó la concentración intracelular del RNA del virus de la hepatitis B y HBSag<sup>11,12</sup>, también se ha evaluado la actividad de la curcumina frente al virus de *Epstein-Barr* y se observó que esta molécula, inhibe eficientemente la proteína BZLF1 necesaria para la duplicación viral<sup>13</sup>. En el año 2007, Si et al, publicaron un trabajo realizado con curcumina y el virus coxsackie, en el cual concluyeron que el tratamiento con curcumina reduce significativamente la expresión del ARN viral, la síntesis proteica y el título viral, además protege la célula del efecto citopático inducido por el virus y la apoptosis<sup>14</sup>. En el año 2006 Siew T et al, reportó que extractos de varias plantas de la familia Zingiberáceas incluida la *Cúrcuma longa* posee actividad inhibitoria dosis dependiente de la proteasa viral de dengue 2 (NS2B/NS3), en este estudio se utilizaron extractos crudos, etanólicos y fracciones obtenidas con hexano de varias plantas de la familia Zingiberáceas; por lo que se concluyó que los extractos de *Cúrcuma longa* deben ser estudiados en su actividad antiviral frente a dengue<sup>15</sup>, Dutta K et al 2009, demostraron que la curcumina inhibía la producción viriones del virus de encefalitis japonesa, a través de la inhibición del proteosoma<sup>16</sup>, Chen TY et al, en el 2013, reportaron que la curcumina posee la capacidad de inhibir la penetración celular de diferentes virus envueltos incluido el virus dengue, también reportan que este efecto no ocurre cuando la infección ya se encuentra instaurada en la célula, además encontraron que la curcumina tiene la capacidad de inhibir la hemoaglutinina del virus de la influenza y por lo tanto inhibir su infección<sup>17</sup>.

**Curcumina y alteración del sistema ubiquitina-proteosoma:** En la literatura se ha reportado que el sistema ubiquitina proteosoma es necesario para la activación y regulación de muchas vías metabólicas necesarias para vida de la célula, como por ejemplo el ciclo celular, proliferación, diferenciación, angiogenesis entre otros<sup>23</sup> además, se ha demostrado que la inhibición del proteosoma puede inducir apoptosis<sup>24</sup>, También se ha reportado que la curcumina induce muerte celular en el modelo de cáncer a través de la alteración del sistema ubiquitina-proteosoma<sup>25</sup>, en el 2002 Mullally et al, pudieron demostrar que la curcumina y otras moléculas, inducen la inhibición de la enzima ubiquitin isopeptidasa, la cual es responsable de la eliminación de la ubiquitina en las proteínas en el complejo 19S del proteosoma, lo que permite la recirculación de la ubiquitina y la regulación

de la actividad de una gran variedad de proteínas; también demostraron que la inhibición de esta enzima estaba relacionada con la inducción de apoptosis<sup>26</sup>. Milacic V et al en el 2008, evidenciaron que la curcumina inhibía la actividad proteasa del sistema ubiquitina proteosoma, debido a que el carbono carbonilo de la curcumina, interactúa directamente con el residuo de treonina en el anillo terminal de la subunidad 26S del proteosoma celular<sup>27</sup> De igual manera como se mencionó anteriormente, en el año 2007, Si et al, en trabajos realizados con el virus coxsackie demostraron que parte de la actividad antiviral está relacionada con la inhibición del complejo ubiquitina-proteosoma; ya que encontró un aumento en las proteínas ubiquitinizadas en el citoplasma celular<sup>14</sup>. Por otra parte, Dutta K et al 2009, demostraron que la curcumina inhibía la producción viriones del virus de encefalitis japonesa, a través de la inhibición del proteosoma<sup>16</sup>.

**Citoesqueleto y virus:** Diferentes estudios han evidenciado el papel del citoesqueleto en la infección viral, es así como, en el año 2002 y 2003 se reportó, que el virus Herpes Simple 1 y el parvovirus, utilizan los microtúbulos como medio de transporte para llegar al núcleo mediado por dineína<sup>28,29</sup>. Posteriormente, Jibin Wang y colaboradores (año 2009) reportaron que el ensamblaje de la proteína M del coronavirus está asociado a la actina y que la mutación de A 159 y K 160 inhibe esta intracción<sup>30</sup>.

Referente al virus dengue en el año 2004, Chee Y et al, demostraron mediante espectrofotometría de masas la interacción entre una proteína de 48 kD de las células de mosquito C6/36 y la proteína E del DENV-2, la cual está relacionada con las cadenas de  $\alpha$  y  $\beta$  de la tubulina<sup>31</sup>. en el año 2008 se reportó en dos estudios diferentes, uno en Argentina y otro en México, que la penetración del virus dengue a las células de mosquito (*Aedes albopictus* y C636 respectivamente) se realizaba, a través de vesículas recubiertas con clatrina, de igual manera, reportaron que la alteración de la actina disminuye la producción de viriones de dengue en la células infectadas; mientras que la alteración de los microtúbulos produjo resultados diferentes en cuanto a la disminución de viriones; En el reporte argentino no se demostró disminución pero en el mexicano sí <sup>32,33</sup>. Por su parte, Shrivastava et al 2011, demuestran que 8 horas después de la infección con DENV-2 en células BHK-21, se presentó una co-localización, entre los microtúbulos y la proteína de envoltura del DENV-2, por lo que concluyeron que los microtúbulos son necesarios para el transporte de la proteína E<sup>34</sup>.

**Curcumina y citoesqueleto:** se han reportado pocos estudios donde se demuestre la acción directa de esta molécula sobre el citoesqueleto; en el año 2004, Holly reportó disrupción de los microfilamentos y la motilidad celular en células PC-3 y LNCaP, observándose un mayor efecto en las células PC-3, además se evidenció un aumento de las fibras de estrés y de F-actina<sup>35</sup>. En el año 2006, Gupta y colaboradores, reportaron que la curcumina es un inhibidor dosis dependiente de los microtúbulos en células HeLa y MCF-7, altas dosis, indujeron despolimerización de los microtúbulos en interfase y del huso mitótico, además, informaron que este efecto se debió a un unión directa entre la curcumina y la

tubulina lo que generó cambios conformacionales en esta<sup>36</sup>. En el año 2009, Chen Q y colaboradores, reportaron inducción de apoptosis en células A549 tratadas con curcumina por alteración de la arquitectura de los microfilamentos de actina y una disminución de los niveles de F-actina; este efecto fue dosis y tiempo dependiente<sup>37</sup>. Chakraborti y colaboradores en el 2011 encontraron en un estudio de acoplamiento, que la curcumina se unía a la tubulina cerca del sitio de unión del vinblastina<sup>38</sup>.

**Curcumina y apoptosis.** Se han publicado diferentes trabajos, principalmente en el modelo de cáncer, que demuestran que la curcumina induce apoptosis a través de diferentes vías (intrínseca y extrínseca) por la regulación de múltiples moléculas dentro de las que se incluyen, Citocromo c, Fas/caspasa 8, P53 dependiente, alteración del proteosoma, alteración del citoesqueleto, estrés del retículo endoplasmático<sup>39-46</sup>.

### III. Marco teórico

#### Dengue.

Es actualmente una de las más frecuentes arbovirosis que afectan al hombre y constituye un severo problema de salud pública en el mundo, especialmente en la mayoría de los países tropicales, donde las condiciones del medio ambiente favorecen el desarrollo y la proliferación de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* los principales vectores de la enfermedad<sup>18,19,47-49</sup>. A partir de 1995 se estima que su distribución es comparable con la malaria y cerca de 2.5 billones de personas viven en áreas de riesgo para su transmisión. Cada año aproximadamente 100 millones de casos de dengue, 500 mil casos de dengue severo y 25.000 muertes anuales son reportados a la OMS<sup>18,19,47-49</sup>. El dengue puede ser definido como una enfermedad febril aguda, causada por un arbovirus, lo que significa que el agente etiológico es transmitido a las personas a través de la picadura de mosquitos. El virus pertenece a la familia Flaviviridae y la infección que produce resulta en un amplio espectro de presentación clínica, que va desde formas subclínicas y leves, hasta cuadros con severo compromiso vascular y de los mecanismos de coagulación<sup>22,50,51</sup>. En una infección primaria con cualquier serotipo se adquiere inmunidad contra una reinfección con el serotipo homólogo, pero no contra serotipos heterólogos; estos anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada frente a otros serotipos, sin presentar neutralización viral, por el contrario, facilitan la infección de otras células de la estirpe monocito/macrófago, lo que provoca una sobre infección celular y sobre producción de citoquina, que generan un desequilibrio hídrico y electrolítico, produciendo las formas severas de la enfermedad.<sup>51-52</sup>. Durante tres décadas, la OMS, ha reconocido y recomendado la clasificación del dengue en: fiebre del dengue (FD), fiebre hemorrágica dengue (FHD) con o sin síndrome de choque por dengue (SCD). (OMS. 1997). Pero en los últimos años, se han publicado diferentes artículos que cuestionan la utilidad de esta clasificación, por esta razón, el TDR/OMS (Programa de Adiestramiento e Investigación en Enfermedades Transmisibles de la Organización Mundial de la Salud) auspició un estudio internacional, llamado DENCO (Dengue Control), cuyo objetivo principal fue obtener información de un número elevado de enfermos con dengue confirmado y encontrar una mejor forma de clasificarlos, así como identificar cuáles serían los signos de alarma que fueran útiles para mejorar el protocolo de manejo de casos de dengue; debido a ello, se generó una propuesta de clasificación binaria de la enfermedad: dengue y dengue severo. Los criterios de dengue severo son los siguientes: a) Extravasación severa de plasma, expresada en Choque hipovolémico, y/o por dificultad respiratoria debida al exceso de líquidos acumulado en el pulmón. b) Hemorragias severas, según criterio del médico tratante, y c) la afectación de órganos: hepatitis severa por dengue (transaminasas superiores a 1000 unidades), encefalitis por dengue o la afectación grave de otros órganos, como la miocarditis por dengue. Estos criterios de severidad tuvieron 95% de sensibilidad y 97% de especificidad<sup>22,53</sup>, pero actualmente se han reportado nueva sintomatología en pacientes con dengue

principalmente en niños, los cuales no pueden ser clasificados de acuerdo al estudio DENCO<sup>54</sup>.

El agente causal pertenece a la familia flaviviridae, género flavivirus, posee 4 serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4. Es un virus envuelto, con nucleocapside de simetría icosaédrica; su RNA es de polaridad positiva, de aproximadamente 11 Kb, su extremo 5´, es metilado y el extremo 3´ es no poliadenilado. El RNA viral contiene un "open reading frame" (fragmento de lectura abierto), que codifica una única poli-proteína, la cual es procesada en 10 proteínas: 3 estructurales (E: de envoltura, M: asociada a membrana y C: de capside), y 7 no estructurales (Ns1, 2a, 2b, 3, 4a, 4b, y 5), este procesamiento se realiza a través de proteasas celulares y una serina proteasa viral<sup>20,21</sup>. La proteína de envoltura es el principal determinante antigénico al cual se dirige la respuesta inmune del hospedero, la proteína asociada a membrana, presenta dos formas dependiendo de la maduración del virión, la proteína Pre-M, que se encuentra asociada a viriones inmaduros y la proteína de membrana madura (M) que resulta de la proteólisis de la región amino terminal de la proteína Pre-M. La proteína de la capside pesa 11Kd, es altamente básica lo que facilita la interacción con el RNA viral, además contiene dominios hidrófobos que permiten la interacción con membranas celulares, permitiendo el ensamblaje del virión<sup>21,22.55</sup>. Las proteínas no estructurales cumplen diferentes funciones en la replicación del virus, algunas tienen función de serina proteasa y helicasa ( NS3 ), otras tienen función de RNA polimerasa dependiente de RNA y metilasa (NS5) y algunas de ellas no se les ha determinado su función<sup>21,22.55</sup> la Proteína no estructural NS1(40-50 KDa) es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso, como una proteína monomérica, lo cual poco tiempo después, se une de forma no covalente, formando dímeros y en células de mamífero se secreta en forma de hexámero; su función no está aun bien definida, pero se ha observado que puede ser necesaria para la replicación temprana del virus<sup>21,22.55.56</sup>.

### **Curcuma Longa y curcumina.**

Es una planta medicinal que se ha cultivado tradicionalmente en la India, Sri Lanka, Filipinas, Indonesia, Jamaica, Trinidad, China y otros países tropicales. Botánicamente se ha clasificado en la Clase: Liliopsida, Subclase: Commelinids, Orden: Zingiberales, Familia: Zingiberaceae, Género: *Cúrcuma*, Especie: *Cúrcuma longa*. Tiene tallo corto, hojas grandes rectangulares y rizomas alargados de color amarillo, la cúrcuma ha sido utilizada como condimento, colorante y medicinalmente, desde tiempos inmemoriales en Asia e India. La cúrcuma contiene 6,3% de proteína, 5,1% de grasa, 3,5% de minerales, 64,9% de carbohidratos, y 13,1% de humedad; dentro de los metabolitos encontramos la curcumina (diferuloymethano), que es la responsable del color amarillo y está compuesta a su vez por curcumina (77%), demetoxicurcumina (17%) y bisdemetoxicurcumina (3%), la curcumina es el mayor componente de la cúrcuma<sup>1-4</sup>; es insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos, es estable a pH 1-6 e inestable a pH neutro o básico; en buffer fosfato salino más del 90% de la curcumina se degrada en los primeros 30 minutos, en medios de cultivo celular

suplementado con 10% en suero fetal bovino se degrada en forma paulatina llegando a un 50% a las 8 horas<sup>1</sup>. Respecto a la actividad farmacológica de la cúrcuma y curcumina, se han publicado varios artículos donde se ha investigado su actividad antitumoral, inmunomoduladora, antioxidante, antiinflamatorio, antifúngica, antiviral, antiparasitaria, de igual manera, en la medicina tradicional se ha utilizado la curcumina en el tratamiento del sistema gastrointestinal, cardiovascular, sistema nervioso central; también ha sido utilizada en enfermedades reumáticas, diabetes, infertilidad, estrés<sup>1-17</sup>.

### **Ubiquitina.**

Es una proteína con 76 aminoácidos y 8,6 kDa, no posee enlaces disulfuro, está formada por cinco láminas beta y una gran hélice alfa, es estable al calor y posee una estructura globular, su nombre se debe a su presencia ubicua en casi todos los tipos de células, es también, una de las proteínas más conservadas durante la evolución, la secuencia de aminoácidos es casi idéntica desde los insectos al hombre. La ubiquitina, tiene gran capacidad para conjugarse con otras proteínas en un proceso que requiere energía. La ubiquitinación se lleva a cabo en residuos de lisina y pueden presentarse diferentes tipos, los cuales están relacionados con funciones diferentes, es así, como la mono y di-ubiquitinación están relacionadas con la endocitosis y traducción de señales y transporte de membrana; la poliubiquitinación en el residuo de lisina 63 está asociada con endocitosis, activación de protein kinasas, reparación del DNA, entre otras y la poliubiquitinación del residuo de lisina 48, está asociada con la degradación de las proteínas por el proteosoma<sup>57-58</sup>.

### **Proteosoma.**

El proteosoma es un complejo multiprotéico formado por 65 sub-unidades y 3 sub-complejos: 20S, 19S y 11S, el sub-complejo 20S es el core enzimático responsable de la degradación proteica, es cilíndrico, posee de 4 a 7 anillos y está flanqueado en ambos lados por un complejo regulador 19S<sup>59,60</sup>, la degradación proteica por el proteosoma se lleva a cabo a través de dos procesos sucesivos:

1. poliubiquitinación de la proteína: Este proceso se lleva a cabo a través de tres etapas sucesivas:

1.1 Activación de la ubiquitina: es una reacción dependiente de ATP, en la cual el carboxilo terminal de la ubiquitina se conjuga con la enzima activadora mediante un enlace tioéster .

1.2 Transferencia de la ubiquitina al transportador: la ubiquitina se transfiere a un grupo SH de la enzima transportadora.

1.3 Transferencia de la ubiquitina a la proteína correspondiente: La ubiquitina ligasa transfiere la ubiquitina activada a un grupo amino de una lisina de una proteína sustrato formando un enlace isopeptídico.

2. degradación de la proteína poliubiquitinizada por el proteosoma: este proceso se ha dividido en varios pasos que incluyen:

2.1 Reconocimiento y unión del sustrato poliubiquitinizado por el receptor en el complejo 19S.

2.2 Despliegue mecánico de la proteína sustrato, dependiente de ATP.

2.3 Introducción de la proteína desplegada en el núcleo 20S después de haberse desprendido la cadena de poliubiquitina por acción de isopeptidasas.

2.4 Rotura de la proteína en fragmentos de 8 a 9 residuos.

2.5 Salida de los péptidos por el extremo 19S opuesto <sup>59,60</sup>.

### **Citoesqueleto.**

El citoesqueleto se puede definir como una red de filamentos de proteínas que se extiende por el citoplasma de toda la célula eucariota, proporcionando un armazón estructural que permite entre otras funciones el movimiento de la célula, transporte interno entre los orgánulos y otras estructuras y macromoléculas. Éste está constituido por tres tipos principales de filamentos. Filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos que se mantienen unidos a los orgánulos intracelulares y a la membrana plasmática mediante proteínas accesorias, los filamentos de actina se generan por la polimerización de actina, los filamentos intermedios están compuestos por diferentes proteínas y se conocen más de 65 de ellas, los microtúbulos se generan por la polimerización de tubulina; tanto la actina como la tubulina están asociados al movimiento celular, mientras que los filamentos intermedios parecen desempañar un papel estructural proporcionando resistencia mecánica a las células y a los tejidos <sup>61</sup>.

### **Apoptosis.**

La apoptosis es una forma de muerte celular que está regulada genéticamente y no genera inflamación, se produce por la activación de una serie de proteínas (caspasas) que desencadenan en la condensación de la cromatina, fragmentación del citoesqueleto y el núcleo y generación de cuerpos apoptóticos, los cuales son fagocitados y retirados de los tejidos. Los estímulos que generan apoptosis se pueden clasificar como fisiológicos y patológicos, los fisiológicos ocurren normalmente durante el desarrollo, envejecimiento, mecanismos homeostáticos en el mantenimiento de la población celular de tejidos, entre otros; los patológicos incluyen, reacciones inmunes, agentes tóxicos, infecciones, irradiación, drogas, daño celular. Se ha reportado diferentes vías que inducen apoptosis, la vía intrínseca (dependiente de la mitocondria), la vía extrínseca (dependiente de receptores) y la vía perforina/granzima, todas ellas generan la activación de diferentes caspasas y convergen en una vía de ejecución común donde intervienen la caspas 3, 6 y 7, con excepción de la vía de granzima que puede activar directamente la fragmentación del DNA <sup>62,63</sup>.

### **Retículo endoplasmático y estrés.**

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo multifuncional que coordina el plegamiento de las proteínas, biosíntesis de lípidos, almacenamiento de calcio entre otras funciones; la perturbación o daño de alguno de estos mecanismos, pueden generar la acumulación de proteínas alteradas o aglomeración proteínas, que a su vez generan estrés del retículo endoplasmático, el cual desencadena una respuesta coordinada para limitar la acumulación de proteínas alteradas, este proceso es conocido como respuesta al estrés del retículo endoplasmático. Durante esta respuesta, se activan principalmente 3 sensores que incluyen: la proteína IRE-1 (inositol requiring element-1), PERK (PKR-like ER kinase), ATF-6 (activating transcription factor 6); estos 3 sensores se mantienen en una forma inactiva en condiciones normales, IRE-1 y ATF-6 unido a la proteína BiP y PERK a chaperonas; la acumulación de proteínas alteradas, genera una liberación de BiP y de las chaperonas lo que produce la activación de los sensores. PERK, genera fosforilación del eIF2 $\alpha$  el cual a su vez, disminuye la síntesis de proteínas.

IRE-1 genera la activación de la proteína XBP-1S, la cual induce la expresión de proteínas que ayudan a la maduración, plegamiento, transporte y degradación de proteínas.

ATF-6 genera la transcripción de genes de chaperonas (por ejemplo GRP78), incrementando la capacidad del retículo endoplasmático en el plegamiento de proteínas. Cuando la respuesta al estrés del retículo endoplasmático falla y no se restaura la capacidad del plegamiento de proteínas, se desencadena la apoptosis por la activación de la vía intrínseca o extrínseca<sup>64,65</sup>.

## **IV. Objetivos del proyecto**

### **1. General**

Evaluar el efecto de la curcumina en la infección del virus dengue en un modelo celular In vitro.

### **2. Específicos:**

2.1 Evaluar el efecto de la curcumina sobre la producción de viriones infectivos de dengue en cultivo celular in vitro.

2.2 Evaluar el efecto de la curcumina sobre el sistema ubiquitina-proteosoma en cultivo de células con y sin infección con DENV-2.

2.3 Evaluar el efecto de la curcumina sobre el citoesqueleto de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, en cultivo de células con y sin infección con DENV-2.

2.4 Evaluar la presencia de la curcumina en la membrana celular y el retículo endoplasmático de células tratadas con esta molécula.

2.5 Evaluar el efecto de la curcumina sobre la activación de respuesta a estrés del retículo endoplasmático en células con y sin infección con DENV-2.

2.6 Evaluar el efecto de la curcumina sobre la generación de apoptosis en células con y sin infección con DENV-2.

## V. Metodología

Se desarrollará en dos ítems, el primero describirá las técnicas generales, que deben estar estandarizadas previamente, para poder realizar la metodología específica. El segundo, corresponde a las técnicas específicas, que permiten resolver los objetivos específicos.

### 1. Metodología general.

**1.1 Tipo de estudio:** se realizó un estudio de tipo experimental.

**1.2 Reactivos y anticuerpos:** La Curcumina, el inhibidor de proteosoma MG132®, la Phalloidin®, Nocodazole®, Paclitaxel®, Lantrunculin® fueron obtenidas de la casa comercial sigma aldrich®. los anticuerpos: Anticuerpo policlonal de conejo antitubulina + anti rabbit unido a alexa fluor 594 de molecular probe TM (rojo), mouse anti-vimentina unido al fluoroforo Cy3 (Naranja), mouse anti-ubiquitin total, mouse anti- $\beta$ -actin; rabbit anti-Perk, rabbit anti-pPERK, rabbit anti-IRE, rabbit anti-ATf-6, Phalloidin unida a TRITC (rojo), anti-mouse fosfatasa alcalina y anti-rabbit fosfatasa alcalina; fueron obtenidas de la casa comercial sigma aldrich®. Mouse anti DENV-2 fue obtenido de la casa comercial Santa cruz biotechnology®, anti-rabbit IgG conjugado con IRDye 700CW y anti-mouse IgG conjugado con IRDye 800CW fueron obtenidos de la casa comercial LI-COR®. el anticuerpo rabbit anti-Ubiquitin Lys48 fue obtenido de la casa comercial Cell Signal®.

**1.3 Amplificación y aumento del título viral:** se utilizó una línea celular de glándulas salivares de insecto *Aedes albopictus* C6/36 HT (ATCC CRL 1660), donadas por Instituto Pedro Kouri Cuba, las cuales se cultivaron en medio L15 (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino (Hyclone®) al 10% y triptosa fosfato al 10%, se incubaron a 33°C por 7 días, luego, se infectaron con un MOI de 0,1 y se incubaron por 7 días, observando diariamente la presencia de efecto citopático, al cabo de este tiempo, las células se congelaron y descongelaron 2 veces, se centrifugó a 2000 rpm para obtener el sobrenadante, donde se encontraban los virus suspendidos, se realizaron alícuotas de 200uL y se guardaron a -70°C para su posterior uso<sup>66,67</sup>.

**1.4 Cultivo de células BHK-21 (ATCC CL-10) y Vero (ATCC CCL-81):** (donadas por el Dr Juan Carlos Gallego Universidad de Antioquia) Se cultivaron en medio DMEM (Gibco®) suplementado, L-glutamina (Eurobio®) y suero fetal bovino (Hyclone®) y 1% de antibiótico antimicótico [10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml; Streptomycin, 25  $\mu$ g/ml; Anfotericina B. (Sigma®)]. Se mantuvo una reserva congelada de cada línea celular para hacer cambio de las células después del pase 8, de esta forma se trató de evitar deriva genética que seleccione clones diferentes. Estas células se incubaron a 37°C en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>.<sup>66,67</sup>

**1.5 Cepa del virus dengue:** La cepa DEN2 New Guinea. Se obtuvo por donación del laboratorio de Neurociencias de la Universidad del Antioquia (Dr Juan Carlos Gallego).

**1.6 Estandarización del título viral por la técnica de recuento de unidades formadoras de placa (PFU):** esta técnica se estandarizó con la asesoría de investigadores del instituto Pedro Kouri de la Habana Cuba. Se evaluaron Células Vero y BHK-21, observándose que las células BHK-21 son más sensibles en la producción de la PFUs, por lo que este modelo celular, fue el que se siguió utilizando para este tipo de experimentos.

Para el establecimiento del título viral de los virus amplificados en el numeral 1.3, se utilizó la técnica de recuento de unidades formadoras de placa (PFU), para lo cual, se sembraron células BHK-21 sobre placas de cultivo celular de 24 pozos (aproximadamente 50000 células por pozo) en medio DMEM (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Hyclone®) al 2%, L-glutamina (Eurobio®) y antibiótico/antimicótico al 1% [10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomina, 25 µg/ml Anfotericina B. (Sigma®)], se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, al día siguiente, se realizaron diluciones seriadas del virus amplificado de 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-7</sup> en medio DMEM solo, en frío, con los cuales se procedió a la infección de las células por 2 horas, después de este tiempo las células se lavaron con PBS (phosphate buffer saline) para eliminar los virus no adheridos y se adicionó medio DMEM (Gibco®) semisólido (con carboximetilcelulosa (sigma®) 3%) suplementado con 2% de SFB (Hyclone®), L-glutamina (Eurobio®) y antibiótico/antimicótico 1% (10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomina, 25 µg/ml Anfotericina B. Sigma®) y se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 8 días; al cabo de este tiempo, se fijaron las células con paraformaldehído (Sigma®) al 4%, se lavaron y se tiñeron con cristal violeta, para examinar el número de unidades formadora de placa (PFU)<sup>66,67</sup>.

**1.7 Evaluación de la concentración citotóxica de curcumina:** Se evaluaron tres métodos: viabilidad con tripan azul, Alamar blue® y Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (sigma®), para lo cual, se tomaron células BHK-21 o Vero crecidas en monocapa (numeral 1.4. Aproximadamente 1x10<sup>5</sup> células por pozo), se les adicionaron diferentes concentraciones de curcumina 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, después de este tiempo, las células se desprendieron y se les adicionó tripan azul al 10% y se observaron directamente al microscopio en cámara de Neubauer para realizar el recuento.

Respecto a la viabilidad medida con Alamar blue®, después del tratamiento con curcumina se adicionó 10% de Alamar blue al medio de cultivo y se realizaron lecturas de absorbancia a 570-nm, cada 4 horas hasta completar 24 horas, el aumento de la absorbancia se midió en el espectrofotómetro EPOCH (Biotek®).

Para la técnica de MTT®, después del tratamiento con curcumina, se adicionó 10% de MTT al medio de cultivo y incubó por 4 horas, para evidenciar el cambio de tetramiltetrazolium a formazan, los cristales formados fueron solubilizados

con una solución de 10% de triton X-100, en isopropanol ácido; posteriormente, se realizó la lectura por espectrofotometría en el equipo EPOCH (Biotek®) a 570-nm; seguidamente, se determinó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la fórmula: absorbancia de las células tratadas/absorbancia del control de células X 100. Esta técnica (MTT) también se utilizó para determinar las concentraciones no tóxicas de otras moléculas utilizadas en esta investigación, que incluyen: MG132®, Phalloidin®, Paclitaxel®, Latrunculin®, Nocodazole®.

**1.8 Presentación al comité de bioética:** Este proyecto fue evaluado y aprobado por el comité de bioética de la facultad de ciencias de la salud de la universidad del Quindío mediante acta 309 del 26 de junio de 2009.

**1.9 Análisis estadístico:** Se realizó en el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV, versión II; para determinar si existía diferencia significativa entre los grupos a evaluar, se realizó análisis de varianza a través de un ANOVA de una o dos vías de acuerdo con los datos y los resultados que se quería analizar, por otra parte, en el recuento de PFUs que no presentaron distribución normal, se realizó el análisis de varianza al logaritmo del recuento de las PFUs con el fin de normalizar los datos.

## **2. Metodología específica:**

Objetivo 2.1: Evaluar el efecto de la curcumina sobre la producción de viriones infectivos de dengue en cultivo celular *In vitro*.

**2.1 Determinación del recuento de PFUs a diferentes tiempos, en sobrenadantes de cultivo celular infectados previamente con DENV-2 y tratados con diferentes concentraciones de curcumina:** Se sembraron 100.000 células BHK-21 sobre placas de cultivo celular de 24 pozos, en medio DMEM (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Hyclone®) al 2%, L-glutamina (Eurobio®) y antibiótico/antimicótico al 1% [10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomina, 25 µg/ml Anfotericina B. (Sigma®)], se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, al día siguiente, se infectaron las células por 2 horas con DENV-2 a una multiplicidad de infección de 1 ó 5 (MOI 1 ó 5 /célula), luego se lavó 2 veces con PBS y se adicionó 1ml de medio DMEM (Gibco®) suplementado con 2% de SFB (Hyclone®), 1% de L-Glutamina (Eurobio®) y 1% de antibiótico antimicótico (10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomina, 25 µg/ml Anfotericina B. Sigma®) y 10 µM, 20 µM y 30 µM, de curcumina grado reactivo (Sigma®), se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, tiempo en el cual se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y se guardaron a -70°C, para realizar posteriormente recuento de unidades formadoras de placa (PFUs). Además, se realizó una cuantificación relativa de la proteína del virus dengue mediante la técnica de *In cell western*.

De igual manera, se recolectaron sobrenadantes de cultivo celular a las 24 h y 48h, posterior al tratamiento con curcumina y se cuantificaron las PFUs por la técnica de recuento en placa<sup>66,67</sup>.

**2.2 Determinación del recuento de PFUs en sobrenadantes de cultivo celular tratados previamente con diferentes concentraciones de curcumina e infectados con DENV-2 :** Se sembraron 100.000 células BHK-21 sobre placas de cultivo celular de 24 pozos, en medio DMEM (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Hyclone®) al 2%, L-glutamina (Eurobio®) y antibiótico/antimicótico al 1% [10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomina, 25 µg/ml Anfotericina B. (Sigma®)], se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, al día siguiente, se realizó tratamiento con curcumina® a 10 µM, 15 µM y 20 µM por 4 h, seguidamente se infectaron las células por 2 horas con DENV-2 a una multiplicidad de infección de 5 (MOI 5 IF/célula), luego se lavó 2 veces con PBS y se adicionó 1ml de medio DMEM (Gibco®) suplementado con 2% de SFB (Hyclone®), 1% de L-Glutamina (Eurobio®) y 1% de antibiótico antimicótico(10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomina, 25 µg/ml Anfotericina B. Sigma®) se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24, 48 y 72 h, tiempo en el cual se recolectaron los sobrenadantes de los cultivo y se guardaron a -70°C, para realizar posteriormente recuento de unidades formadoras de placa (PFUs)<sup>66,67</sup>.

**2.3 Cuantificación del RNA viral en células Vero infectadas con DENV-2:** se realizó extracción del RNA viral de pozos con células infectadas y tratadas con diferentes concentraciones de curcumina con el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit marca Quiagen®, la mezcla y las condiciones del PCR tiempo real fueron estandarizadas previamente por el investigador José Usme Ciro, del grupo de Neurociencias de la universidad del Antioquia.

Objetivo 2.2: Evaluar el efecto de la curcumina sobre el sistema ubiquitina-proteosoma en cultivo de células con y sin infección con DENV-2.

**2.4 Evaluación del efecto de la curcumina sobre el sistema ubiquitina-proteosoma:** se realizaron tratamientos con curcumina (Sigma®) a diferentes concentraciones de 10 µM hasta 70 µM en células BHK-21 ó células Vero (tratamiento de 10 µM a 30 µM en células infectadas con DENV-2 y sin infectar) crecidas en monocapa (numeral 1.4), por un tiempo de 8 h para las células BHK-21 y 24 h para las células Vero. Al término de este tiempo, se determinó la ubiquitina libre, la ubiquitina conjugada y la ubiquitina Lys48, mediante la técnica de western blot, en el producto de la lisis celular utilizando buffer de lisis (50 mM pyrophosphate, 50 mM NaF, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (mevalonato de sodio), 10 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% Triton X-100 y 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)<sup>14</sup>. Para la visualización de las bandas de ubiquitina en el western blot se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón

comerciales específicos contra ubiquitina (Santa Cruz Biotechnoly®) y anticuerpos monoclonales de conejo contra ubiquitina Lys48 (Cell Singal®). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-anticuerpo contra ratón y contra conejo marcado con fosfatasa alcalina (Sigma®); como sustrato se utilizó BCIP/NBT (Sigma®). También, se realizó cuantificación relativa de la ubiquitina-Lys 48, por la técnica de In cell western.

**2.5 Determinación de la alteración del sistema ubiquitina proteosoma sobre la producción de viriones infectivos de dengue:** Se sembraron células BHK-21 sobre placas de cultivo celular de 24 pozos (marca: Greiner Bio-One) (aproximadamente 100000 células por pozo) en medio DMEM (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Hyclone®) al 2%, L-glutamina (Eurobio®) y antibiótico/antimicótico al 1%[10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomina, 25 µg/ml Anfotericina B. (Sigma, USA)], se incubó por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, al día siguiente, se infectaron las células con DENV-2, por 2 horas a un MOI de 5, luego se lavó 2 veces con PBS y se adicionó 1ml de medio DMEM (Gibco®) suplementado con 2% de SFB (Hyclone®), 1% de L-Glutamina(Eurobio) y 1% de antibiótico antimicótico[10,000 unidades/ml Penicilina, 10 mg/ml Streptomina, 25 µg/ml Anfotericina B. (Sigma®)] y diferentes concentraciones del inhibidor de proteosoma MG132: 10 µM, 20 µM y 30 µM (Sigma®), se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, tiempo en el cual se recolectaron los sobrenadantes de los cultivo y se guardaron a -70°C, para realizar posteriormente recuento de unidades formadoras de placa como se describió en el numeral 1.6.

Objetivo 2.3 Evaluar el efecto de la curcumina sobre el citoesqueleto de actina microtúbulos y filamentos intermedios en cultivo de células con sin infección con DENV-2.

**2.6 Determinación de la alteración del citoesqueleto de actina, microtúbulos y filamentos intermedios:** Se sembraron células Vero (aproximadamente 80000 células por pozo) sobre placas multiwell de 24 pozos que contenían laminas de vidrio para que crezcan las células sobre este; en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 2%, L-glutamina y antibiótico/antimicótico al 1%, se incubó por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, al día siguiente, se realizaron tratamientos con curcumina a diferentes concentraciones 10 µM, 15 µM, 20 µM y 30 µM por 24 horas, luego, se realizó, inmunofluorescencia con anticuerpos específicos.

Microtúbulo: Anticuerpo policlonal de conejo antitubulina + anti conejo unido a alexa fluor 594 de molecular probe® (rojo).

Actina: phalloidin unida a TRITC (rojo) de sigma®.

Filamentos intermedios: anticuerpo monoclonal anti-vimentina unido al fluoroforo Cy3 (Naranja) de sigma®. Para evitar el daño del citoesqueleto, las células se lavaron con tapón de citoesqueleto<sup>68</sup>; como control se utilizaron células Vero sin

tratamiento y células Vero infectadas con DENV-2 y se observó en el microscopio invertido de fluorescencia EVOSfl®.

Para evidenciar la proteína viral en la célula infectada, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-dengue marca Santa cruz biotechnology®, se realizó la visualización de las células en un microscopio confocal de disco giratorio marca Olympus® IX-81 y las imágenes fueron capturados por el software Media Cybernetics Imagen Pro Plus®, la intensidad y el contraste fueron mejoradas en el programa Microsoft Office Picture Manager®.

También, se realizaron experimentos con moléculas que presentan efecto comprobado tanto en la estabilización de la actina y microtúbulos como en la desorganización de los mismos, esto con el fin de poder evidenciar si los tratamientos con curcumina en los modelos celulares estudiados presentan efectos similares a los de las moléculas evaluadas; en este estudio se utilizó: Phalloidin (estabilizador de actina, se utilizo a 10µM), Latrunculin (desorganizador de actina, se utilizo a 500nM), Paclitaxel (estabilizador de microtúbulos, se utilizo a 10µM), Nocodazole (desorganizador de microtúbulos, se utilizó a 1µM). Las concentraciones utilizadas de las diferentes moléculas se determinaron mediante la técnica de MTT; se utilizó la menor concentración de la molécula que presentó un porcentaje de viabilidad mayor al 50% y que presentó el efecto de la droga sobre las células.

Objetivo 2.4 Evaluar la presencia de curcumina en la membrana celular y el retículo endoplasmático de células tratadas con esta molécula.

**2.7 Evaluación de la presencia de curcumina en células Vero, glóbulos rojos y membranas de glóbulos rojos:** para ello se realizaron tratamientos con curcumina a concentraciones de 30 µM por 1 h, en células Vero previamente crecidas en cajas de cultivo de 24 pozos, glóbulos rojos humanos de una persona sana (dónante voluntario), tomados por venopunción y membranas de glóbulos rojos obtenidos por lisis de los glóbulos rojos con una solución hipotónica (solución de ácido acético al 0,1 %), posteriormente, se eliminó el medio o la solución con curcumina, se realizaron varios lavados (3 para las células y los globulos rojos y 6 para las membranas), se adicionó medio o solución sin el colorante (DMEM) para las células y PBS para los glóbulos rojos y las membranas) y seguidamente, se tomaron fotos en el microscopio de Fluorescencia Evosfl® y en la cámara digital marca Samsung®. Para tomar las fotos de las membranas, previamente se centrifugó a 2500 rpm.

**2.8 Evaluación de la acumulación de curcumina a nivel del retículo endoplasmático:** para ello se realizó un cultivo de células Vero en caja de cultivo para microscopia de células vivas, como se indicó en el numeral 1.4, posteriormente, se realizó el marcaje del retículo endoplasmático con medio DMEM que contenía 1 µM de ER-Tracker™ Red (Molecular probe®, Invitrogen), por 30 minutos, luego se eliminó este medio y se adicionó medio DMEM que

contenía 30  $\mu\text{M}$  de curcumina y se dejó en incubación por 1 h, se eliminó este medio y se adicionó medio DMEM con 2% de SFB, inmediatamente, se tomaron fotos cada dos segundos en el filtro verde (FITC) y rojo (TRIC) en el microscopio confocal de disco giratorio marca Olympus® IX-81. y las imágenes fueron capturados por el software Media Cybernetics Imagen Pro Plus®, la intensidad y el contraste fueron mejoradas en el programa Microsoft Office Picture Manager®.

Objetivo 2.5 Evaluar el efecto de la curcumina sobre la activación de respuesta a estrés del retículo endoplasmático en células con y sin infección con DENV-2.

**2.9 Determinación de la respuesta a estrés del retículo endoplasmático:** La respuesta al estrés del retículo endoplasmático se determinó a través de la cuantificación relativa de las proteínas PERK; pPERK, ATF-6 e IRE, mediante la técnica de In cell western.

**2.10 Cuantificación relativa de proteínas, por el método de In cell western:** se sembraron  $1.5 \times 10^4$  células Vero por pozo en cajas de 96 pozos (Greiner Bio-One, Monroe INC), en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 2%, L-glutamina y antibiótico/antimicótico al 1%, se incubó toda la noche a 37°C in 5% CO<sub>2</sub> . luego, se realizaron tratamientos con diferentes concentraciones de curcumina (10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ ) por 24h. Posteriormente, las células fueron fijadas con formaldehído al 3,7% por 30 minutos (concentración final), inmediatamente, se realizaron 4 lavados con PBS y se permeabilizó lavando 3 veces con una solución de PBS que contenía 0,1% de triton X-100 (cada lavado se realizó por 10 minutos), seguidamente, se bloqueó con 20  $\mu\text{L}$  de buffer de bloqueo (PBS, 1% albumina y 5% sacarosa) por pozo, posteriormente, se adicionó 20  $\mu\text{L}$  por pozo de la solución de los anticuerpos primarios: uno, mouse-  $\beta$ -Actina (que sirvió como normalizador) y otro Rabbit IgG contra la proteína de interés (proteína del DENV-2, Ubiquitina Lys48, Caspasa 3 activada, proteína PERK, pPERK, ATF-6, IRE) en la dilución adecuada para cada proteína de acuerdo con las indicaciones del fabricante en buffer de bloqueo. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 2 horas, se realizaron nuevamente 4 lavados con PBS (cada lavado de 10 minutos); después se adicionó 20  $\mu\text{L}$  por pozo de la solución de los anticuerpo secundarios uno anti Rabbit igG conjugado con IRDye 700CW (marca LI-COR®) y otro anti-mouse IgG conjugado con IRDye 800CW (marca LI-COR®) se incubó a temperatura ambiente por 1 horas en oscuridad, se realizó nuevamente 4 lavados con PBS (cada lavado de 10 minutos), se dejó secar a temperatura ambiente protegido de la luz y se realizó la lectura pozo por pozo, en el equipo Odyssey IR Scanner®, las imágenes fueron capturadas usando el software 3.0 (USA®). La señal en cada pozo fue cuantificada y normalizada, realizando la proporción: lectura a 700-nm/lectura a 800-nm, donde la lectura a 700-nm corresponde a la proteína de interés y la de 800-nm corresponde al normalizador de  $\beta$ -Actina, de tal manera que la variación en el número de células en el pozo no afecte la cuantificación real de la proteína de interés.

Objetivo 2.6 Evaluar el efecto de la curcumina sobre la generación de apoptosis en células con y sin infección con DENV-2.

**2.11 Determinación de la generación de apoptosis:** Se determinó mediante citometría de flujo en el equipo FC 500 marca Beckman coulter® usando el kit comercial Aposcreen anexin V-7AAD, (Rochem Biocare®) siguiendo las indicaciones del fabricante. Antes de realizar la medición por citometría; se realizó una estandarización de la técnica en el equipo FC 500 que consistió en evaluar previamente con controles para necrosis, apoptosis temprana (marcaje con anexina V), apoptosis tardía (marcaje con anexina V y 7AAD) la clasificación adecuada de las poblaciones celulares (anexo 1).

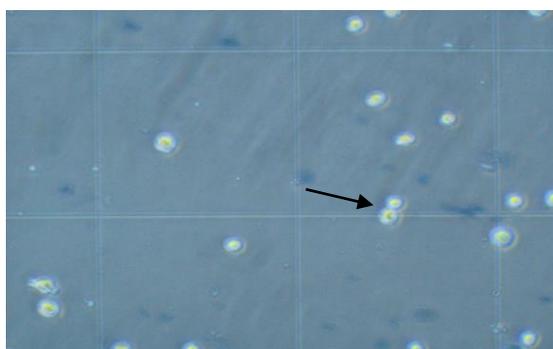
Para confirmar la activación de apoptosis por parte del tratamiento con curcumina, se realizó cuantificación relativa de la caspasa 3 activada, por el método de In cell western.

**2.12 Evaluación del efecto de la curcumina sobre células Vero transfectadas con marcaje para mitocondria.** Estas células fueron transfectadas en el grupo medicina molecular y de traslación de la universidad de Antioquia y fueron donadas para los experimentos con curcumina, Las células se prepararon de la siguientes manera: se sembraron  $3.0 \times 10^5$  células Vero en cajas de 6 pozos x 12h, luego, se adicionó la mezcla del Plasmido mKate-mito (Evrogen®) con lipofetamine 2000 (Life technologies®) por 5 h, después de este tiempo, se retiró el medio y se adicionó DMEM nuevo, a las 24 h se comprobó la expresión del reportero, luego, se despegaron las células y se sometieron a una selección por sorting para sembrar una célula por pozo, luego, a las células seleccionadas se les adicionó 1,5mg de g-418 (sigma ®); cuando las células formaron colonias, se revisó cuales expresaron el gen reportero y se expandieron en cultivo. Por último, Estas células se crecieron sobre vidrios como lo indica el numeral 2.6, luego, fueron tratadas con diferentes concentraciones de curcumina (10  $\mu$ M a 20  $\mu$ M) por 24 horas, después se fijaron como se mencionó anteriormente (numeral 2.6) y se observaron en el microscopio confocal de disco giratorio marca Olympus® IX-81 y las imágenes fueron capturados por el software Media Cybernetics Imagen Pro Plus®, la intensidad y el contraste fueron mejoradas en el programa Microsoft Office Picture Manager®.

## VI. RESULTADOS.

### 1. Determinación de las concentraciones no tóxicas de curcumina y de otras moléculas.

1a. Control de Células viables



1b. Células tratadas con 40  $\mu\text{M}$  de curcumina

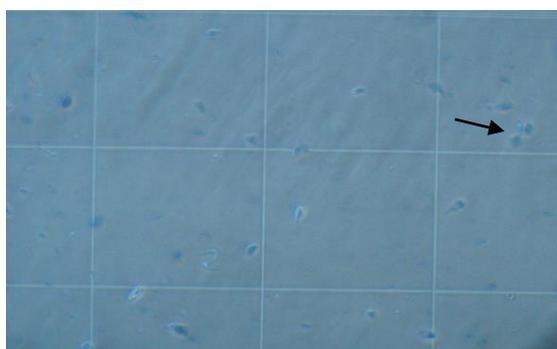


Figura 1: Determinación de la Viabilidad celular por el método de tripan azul en células BHK-21.

En la Figura 1a, se observan células viables, las cuales se caracterizan por ser redondas refringentes, brillantes y no toman la coloración azul (flecha negra), las cuales fueron contadas en cámara de Neubauer, En la figura 1b se observa las células muertas las cuales toman el color azul debido al daño de la integridad de la membrana celular.

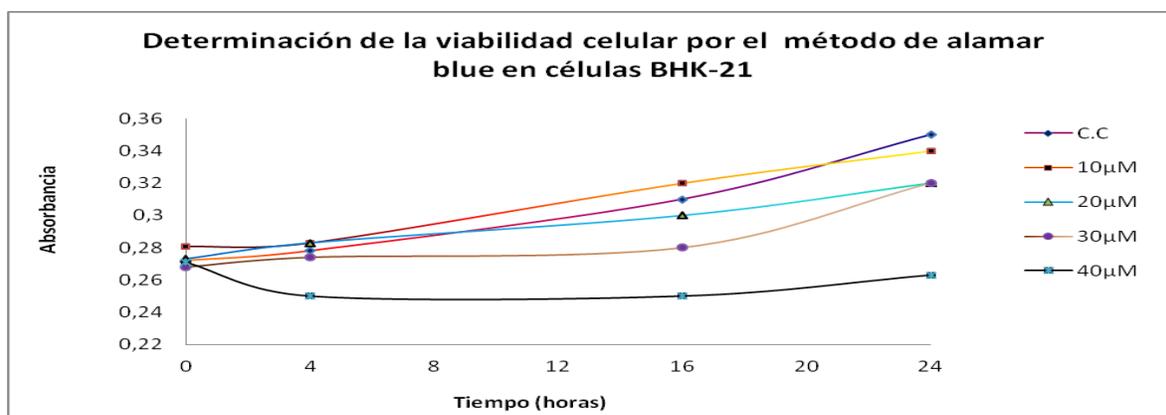


Figura 2 Determinación de la Viabilidad celular por el método de alamar blue en células BHK-21.

CC: control de células tratadas con 0,24% de DMSO; 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 40  $\mu$ M tratamientos con curcumina 0, 4, 16, 24 horas. La gráfica muestra la media de dos experimentos por duplicado, de las lecturas de absorbancia a 570-nm; n=4.

Figura 2. Se evidencia la absorbancia versus el tiempo de las células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina. Se determinó, que el control de células sin tratamiento y las células tratadas con 10  $\mu$ M de curcumina, presentaron absorbancia similar. En el tratamiento con 20  $\mu$ M de curcumina, se observó un aumento paulatino de la absorbancia en el tiempo, pero esta fue menor, que en el control; en el tratamiento con 30  $\mu$ M de curcumina, se evidenció un aumento discreto de la absorbancia a las 24 horas, mientras que, en el tratamiento con 40  $\mu$ M, se encontró una disminución en los valores de absorbancia.

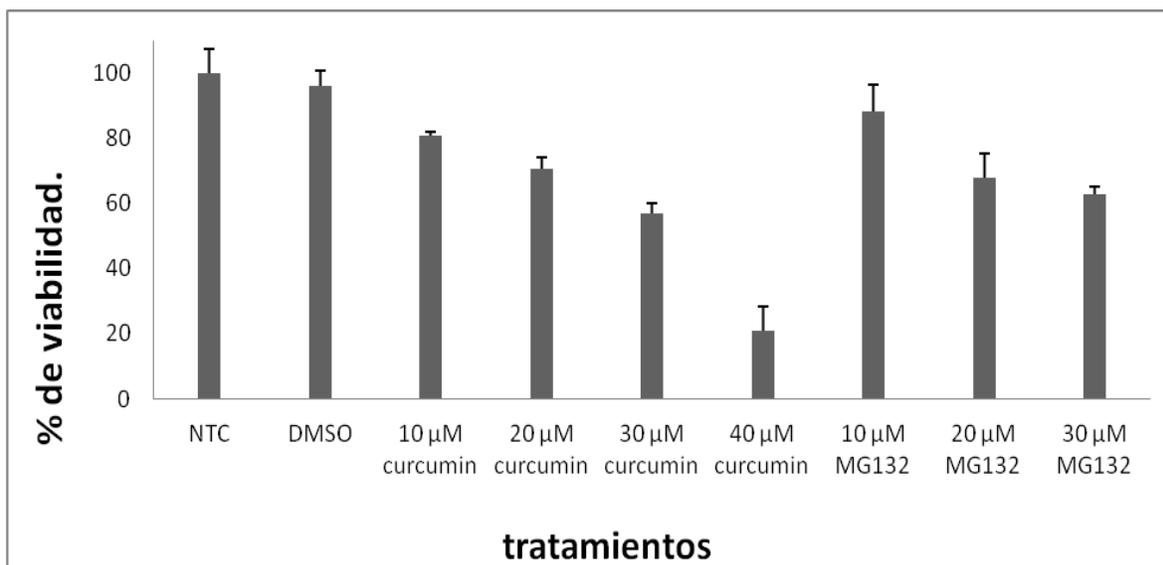


Figura 3a: Determinación del Porcentaje de viabilidad de las células BHK-21 tratadas con diferentes concentraciones de curcumina y MG132, por el método de MTT.

NTC: células control sin tratamiento, C.DMSO: células control tratadas con 0,24% de DMSO, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M y 40  $\mu$ M tratamiento con curcumina o MG132. La gráfica representa la media y la desviación estándar del porcentaje de viabilidad de 3 experimentos por duplicado, n=6.

En la figura 3a, se observa la disminución de la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración de curcumina. Por este método, aproximadamente el 60% de las células eran viables, cuando se trataron por 24 h con 30  $\mu$ M de curcumina, además, se observó una disminución de la viabilidad al 20%, cuando se trabajó con la concentración de 40  $\mu$ M, estos resultados son concordantes con el recuento realizado en cámara de Neubauer y el método de Alamar bleu®; donde a concentraciones de 40  $\mu$ M, un mayor número de células tomaban el colorante tripan azul y los valores de absorbancia disminuían a las 24 h (figura 1B

y 2). Respecto al inhibidor de proteosoma MG132®, se observó una viabilidad celular dosis dependiente similar a la curcumina, evidenciándose, que a concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  la viabilidad celular se encuentra alrededor del 60% (figura 3a).

Después de revisar la viabilidad celular por los tres métodos descritos anteriormente, la máxima concentración que se tomó para realizar los tratamientos en los demás ensayos fue la de 30  $\mu\text{M}$ . y el método que se utilizó para experimentos posteriores fue el MTT.

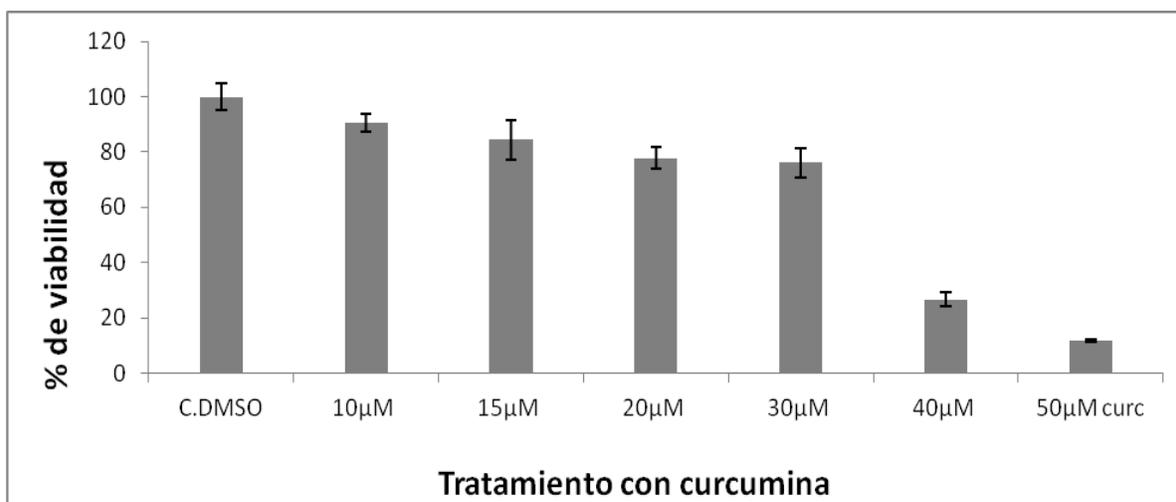


Figura 3b: Determinación del Porcentaje de viabilidad de células Vero tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, por el método de MTT.

NTC: células sin tratamiento, C.DMSO: células tratadas con 0,24% de DMSO, 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  tratamiento con curcumina. La gráfica representa la media y la desviación estándar del porcentaje de viabilidad de 2 experimentos por duplicado  $n=4$ .

Como se observa en el figura 3b, la viabilidad celular disminuye a medida que aumenta la concentración de curcumina, pero este efecto se hace más evidente a partir del tratamiento con 40  $\mu\text{M}$ , similar a lo observado en las células BHK-21 (figura 3a). En ambos tipos celulares, la máxima concentración utilizada de curcumina fue la de 30  $\mu\text{M}$ .

A partir de los datos de viabilidad, se determinó la concentración citotóxica 50 ( $\text{CC}_{50}$ ) de la curcumina en las células Vero y BHK-21 mediante regresión lineal; la cual fue de 33,3  $\mu\text{M}$  y 29,5  $\mu\text{M}$  respectivamente. También se determinó el porcentaje de inhibición 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) y el índice de selectividad en las células BHK-21. El porcentaje de inhibición 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) se definió como la mínima concentración de curcumina que inhibía la producción del 50% de PFUs, respecto al control

infectado sin tratamiento y el índice de selectividad se halló, mediante la relación ( $IC_{50}/CC_{50}$ ), los resultados obtenidos fueron de  $11,51 \mu M$  para el  $IC_{50}$  y  $2,56$  el índice de selectividad.

Estos resultados corroboran que la concentración mayor de curcumina con la que se debía trabajar era  $30 \mu M$ . Por otra parte, el índice de selectividad bajo, nos permite sugerir que el efecto de la curcumina es sobre la célula y no específicamente sobre el virus.

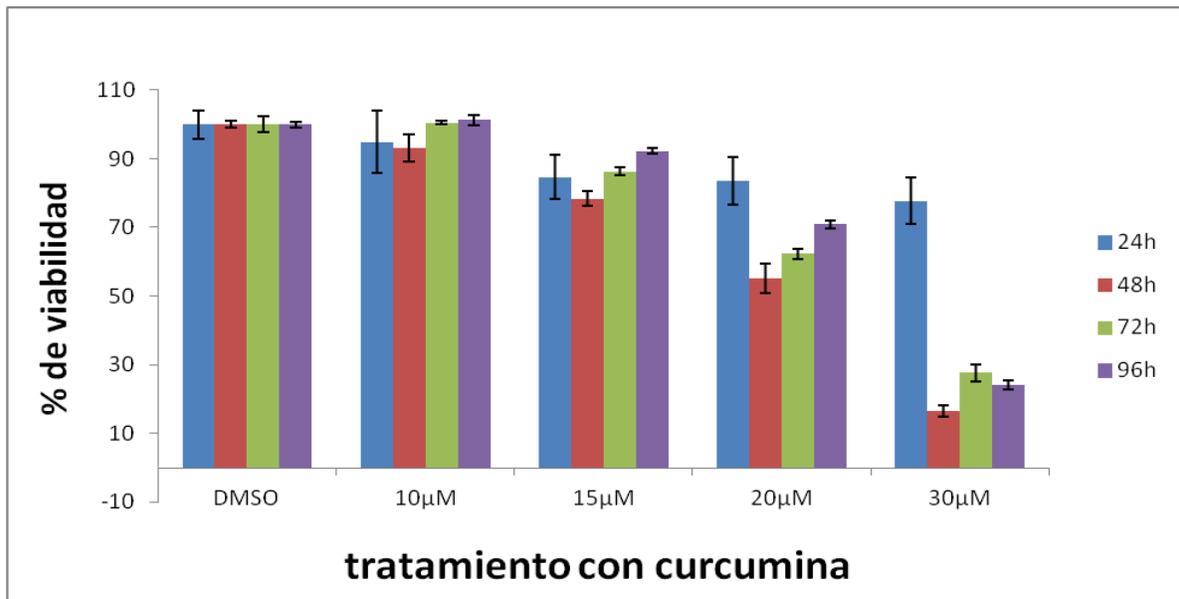


Figura 3c. Determinación del Porcentaje de viabilidad de las células Vero tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones de curcumina y medido por 96 horas.

C.DMSO: células tratadas con 0,24% de DMSO,  $10 \mu M$ ,  $15 \mu M$ ,  $20 \mu M$ ,  $30 \mu M$  tratamiento con curcumina, las barras azules representan la media y la desviación estándar del porcentaje de viabilidad medido a las 24 h, las barras rojas representan la media y la desviación estándar del porcentaje de viabilidad medido a las 48 h, las barras verdes representan la media y la desviación estándar de el porcentaje de viabilidad medido por 72 h. las barras moradas representan la media y la desviación estándar del porcentaje de viabilidad medido por 96 h. La gráfica representa 2 experimentos por duplicado,  $n=4$ .

En la figura 3c se observa el porcentaje de viabilidad de las células Vero medido por 96h, después de un tratamiento con diferentes concentraciones con curcumina realizado en la primeras 24 h. Se evidenció un porcentaje de viabilidad por encima del 60% en las primeras 24 h de tratamiento con curcumina, a partir de este tiempo, se observó una disminución de la viabilidad celular a las 48 h, en los tratamientos mayores e iguales a  $15 \mu M$  y un aumento de esta, a las 72 h y 96 h.

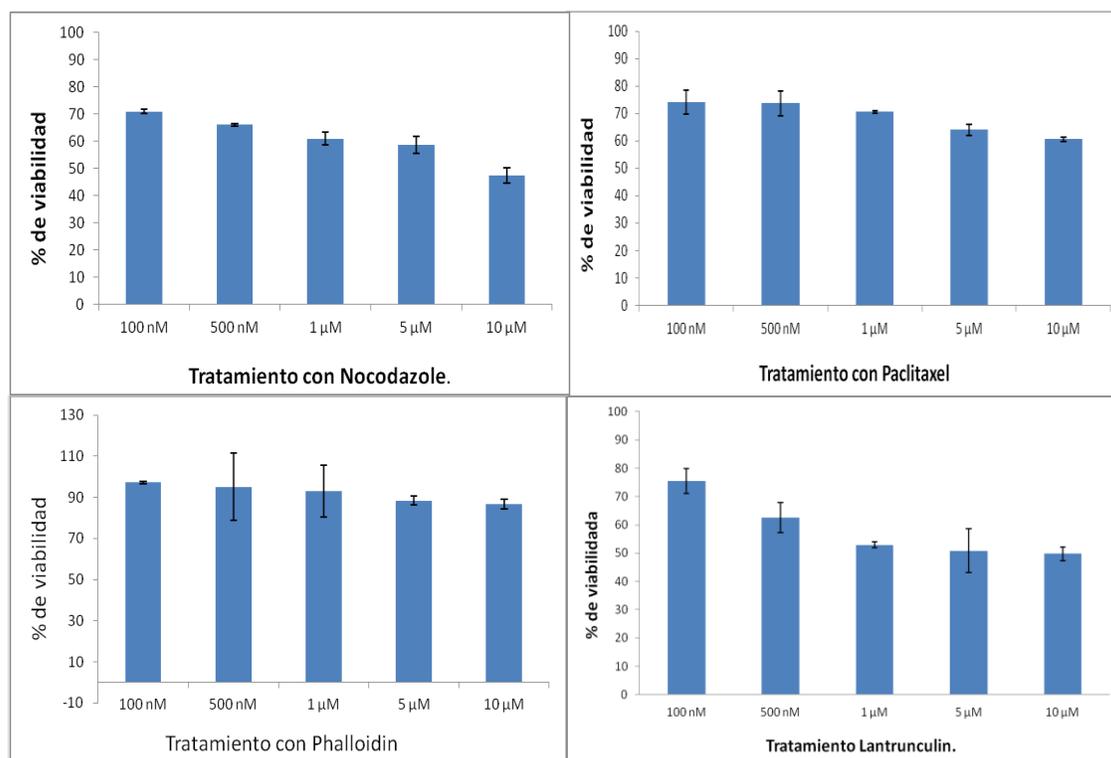


Figura 3d. Determinación del Porcentaje de viabilidad de células Vero tratadas con Nocodazole, Paclitaxel, Phalloidin, Lantrunculin, por el método de MTT.

Nocodazole, Paclitaxel, Latrunculin y Phalloidin, tratamiento con diferentes moléculas, La barras representan la media y la desviación estándar del porcentaje de viabilidad de 2 experimentos por duplicado, n=4.

En la figura 3d, se evidencian los porcentajes de viabilidad obtenidos después del tratamiento con Nocodazole, Paclitaxel, Latrunculin y Phalloidin. La molécula que presentó menor toxicidad fue la Phalloidin, seguida de Paclitaxel, Nocodazole y Lantrunculin.

## 2. Evaluar el efecto de la curcumina sobre la producción de viriones infectivos de dengue en cultivo celular In vitro.

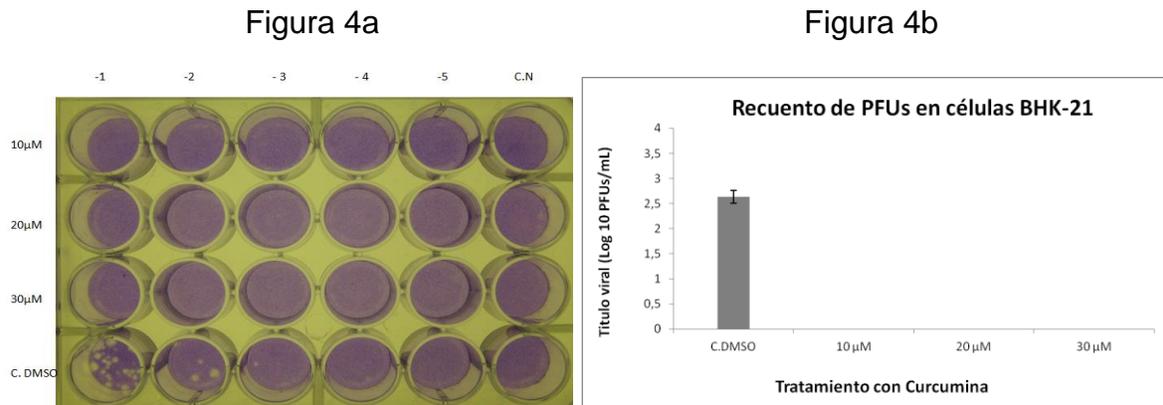


Figura 4. Recuento de unidades formadoras de placa de los sobrenadantes de cultivos infectados con DENV-2 a una MOI 1 y tratados con diferentes concentraciones de curcumina.

C.N: control de células sin infección; C. DMSO: células infectadas a un MOI de 1 y tratadas con 0,24% de DMSO; 10 µM, 20 µM y 30 µM: la figura 4a representa la técnica de recuento en placa y la figura 4b, representa la media y la desviación del recuento de PFU en Log<sup>10</sup> de 3 experimentos por duplicado, n=6.

En la figuras 4a se observa el ensayo de recuento en placa de los sobrenadantes de las células infectadas a una MOI 1 y tratadas con diferentes concentraciones de curcumina sigma®; como se evidencia en la figura. hay una disminución de las unidades formadoras de placa (PFU), en las células tratadas con curcumina (no se observan PFUs), respecto al control de infección tratado con DMSO. En la figura 4b se representa el recuento de las PFUs de 3 ensayos por duplicado, en el cual, se hace evidente la disminución de los recuentos virales en todas las concentraciones utilizadas de curcumina, demostrando que hay un efecto de esta molécula sobre la producción de viriones infectivos de dengue a esta multiplicidad de infección (MOI).

Para determinar, si el efecto inhibitorio en la producción de viriones infectivos de DENV-2 se presentaba a una multiplicidad de infección más alta, se realizaron ensayos a una MOI de 5.

Figura 5a.

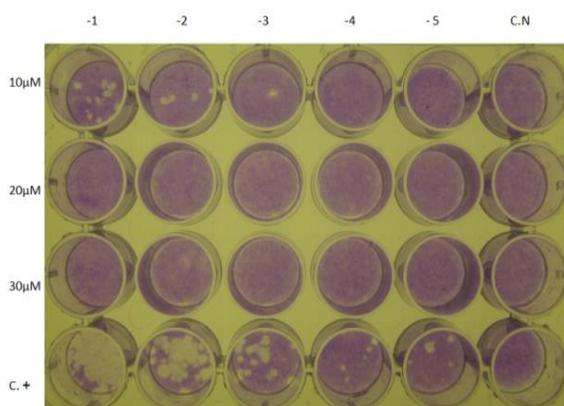


Figura 5b.

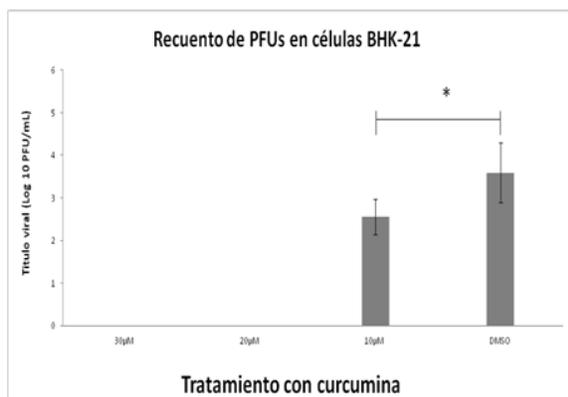


Figura 5. Recuento de las unidades formadoras de placa de los sobrenadantes de cultivos infectados con DENV-2 a una MOI 5 y tratados con diferentes concentraciones de curcumina.

DMSO: control de células infectadas a una MOI de 5 tratadas con 0,24% de DMSO, 10 µM, 20 µM y 30 µM: tratamiento con diferentes concentraciones de curcumina. La figura 5a representa la técnica de recuento en placa y la figura 5b, representación gráfica de la media y la desviación estándar del recuento de PFUs medido en Log<sup>10</sup> de 3 experimentos por duplicado n=6. \* representa diferencia significativa (P < 0,05).

En la figuras 5a se muestra el ensayo de recuento en placa de los sobrenadantes de las células infectadas a una MOI 5 y posteriormente tratadas con diferentes concentraciones de curcumina sigma®, se observó que los tratamientos a 10 µM presenta unidades formadoras de placa (PFUs) pero en menor cantidad que el control de células infectadas sin tratamiento; respecto a las concentraciones de 20 µM y 30 µM no se observan PFUs. La figura 5b, es la representación gráfica del recuento de las PFUs, en donde se hace evidente la disminución de los recuentos virales dependiente de la concentración de curcumina utilizada, demostrando que hay un efecto de esta molécula sobre la producción de viriones infectivos de dengue.

Con el fin de determinar si existía diferencia significativa, entre los recuentos de las PFUs de las células infectadas a un MOI de 5 y tratadas con curcumina y el control de infección tratado con DMSO, se realizó un ANOVA de única vía, y una prueba de rangos múltiples para observar entre cuales de los grupos presentaban dicha diferencia, (se consideró significativo un valor de P menor a 0,05) (figura 6).

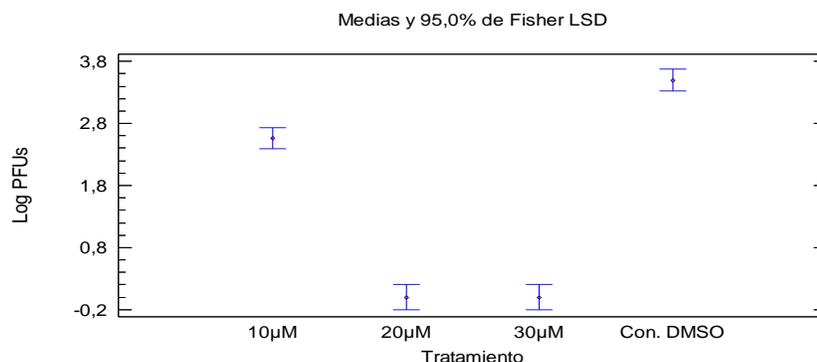


Figura 6. Gráfica generada por el programa Statgraphic Centurion XV. Versión II®, después de realizar un ANOVA de única vía a los datos obtenidos, del logaritmo (Log) del recuento de las PFUs en las células infectadas con DENV-2 a una MOI de 5 y tratadas con curcumina o DMSO.

En la figura 6, se observa la representación gráfica de la media y la desviación estándar de los logaritmos obtenidos de los recuentos de las PFUs de los diferentes ensayos realizados; se evidenció una disminución de las PFUs en los tratamientos con curcumina frente al control de Infección tratado con 0,24% de DMSO. De acuerdo con la prueba de rangos múltiples, existe diferencias significativas entre el control (DMSO) y los tratamientos con curcumina; no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos con curcumina de 20 µM y 30 µM ya que no presentaron recuentos de PFUs. (Figura 6)

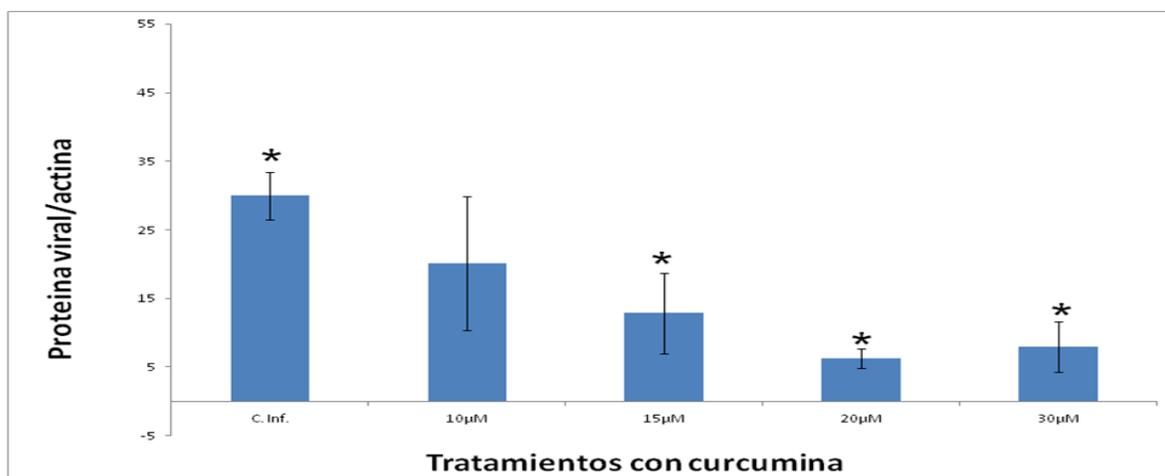


Figura 7. Representación gráfica de la cuantificación relativa de la proteína del DENV-2, por el método de In cell western.

C.inf: control infección, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M tratamiento con curcumina. La gráfica representa la media y la desviación estándar (2 experimento por triplicado, n=6) de la proporción de proteína viral/ actina, de células infectadas con DENV-2 y tratadas con diferentes concentraciones de curcumina. \* representa diferencia significativa (P < 0,05).

La figura 7 representa la proporción obtenida de la cuantificación relativa entre la proteína del DENV-2 y el normalizador de actina. Se evidenció una disminución en la cuantificación relativa de la proteína del DENV-2, de manera dosis dependiente de la concentración de curcumina utilizada, también, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el control de infección tratado con DMSO y los tratamientos de 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 30  $\mu$ M. (P < 0,05).

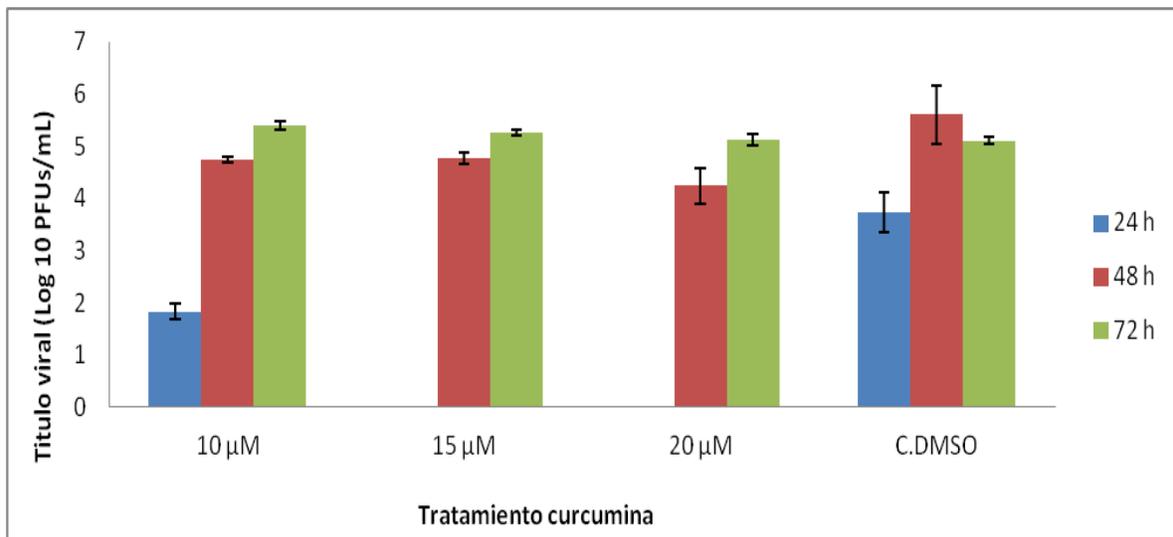


Figura 8. Representación gráfica del recuento del logaritmo ( $\text{Log}^{10}$ ) de las PFUs de los sobrenadantes de cultivos infectados con DENV-2 a una MOI 5 por 72 h. después del tratamiento con curcumina por 24 h.

C. DMSO, células control infectadas y tratadas con 0, 24% de DMSO, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M tratamientos con curcumina, las barras azules representa la media y la desviación estándar del  $\text{Log}^{10}$  del recuento de PFUs a las 24 h, las barras rojas representan la media y la desviación estándar del  $\text{Log}^{10}$  del recuento de PFUs a las 48 h y las barras verdes representan la media y la desviación estándar del  $\text{Log}^{10}$  del recuento de PFUs a las 72 h. La gráfica representa 2 experimentos por duplicado, n=4.

En la figura 8, se observa, que el tratamiento por 24 h con diferentes concentraciones de curcumina, disminuyó la producción de viriones infectivos de dengue de manera dosis dependiente, respecto al control de células infectadas y tratadas con DMSO; a las 48 h los recuentos virales aumentaron pero eran más bajos que el control y a las 72 h, todos los recuentos eran similares al control.

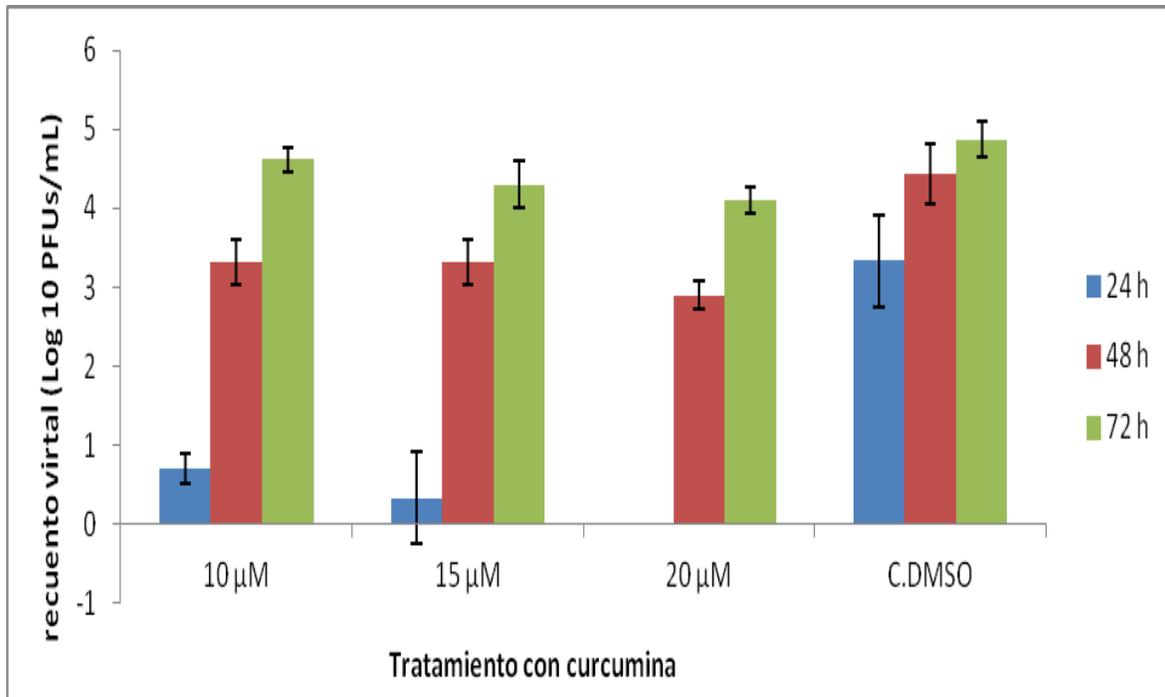


Figura 9. Representación gráfica del recuento del logaritmo ( $\text{Log}^{10}$ ) de las PFUs de los sobrenadantes de cultivos infectados con DENV-2 a una MOI 5 por 72 h. después del tratamiento previo a la infección con curcumina por 4 h.

C. DMSO, células control infectadas y tratadas con 0, 24% de DMSO, 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  tratamientos con curcumina, las barras azules representa la media y la desviación estándar del  $\text{Log}^{10}$  del recuento de PFUs a las 24 h, las barras rojas representan la media y la desviación estándar del  $\text{Log}^{10}$  del recuento de PFUs a las 48 h y las barras verdes representan la media y la desviación estándar del  $\text{Log}^{10}$  del recuento de PFUs a las 72 h. La gráfica representa 2 experimentos por duplicado,  $n=4$ .

En la figura 9 se observa, que el tratamiento previo con diferentes concentraciones de curcumina, disminuyó la producción de viriones infectivos de dengue de manera dosis dependiente en las primeras 24 h respecto al control de células infectadas y tratadas con DMSO, a las 48 h los recuentos virales aumentaron pero eran más bajos que el control; a las 72 h, los tratamientos de 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  con curcumina, presentaron recuentos similares al control, pero estos fueron más bajos en el tratamiento de 20  $\mu\text{M}$ .

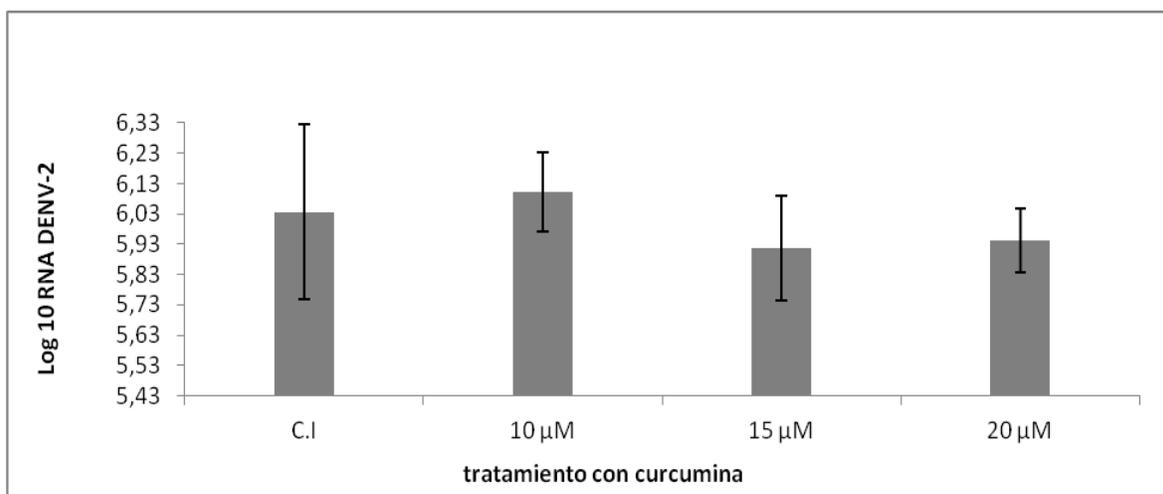


Figura 10. Cuantificación del RNA del DENV-2 a partir de células Vero infectadas.

C.I, control de células infectadas tratadas con 0,24% de DMSO, 10 µM, 15 µM, 20 µM tratamientos con curcumina; Las barras representan la media y la desviación estándar de la cuantificación de RNA del DENV-2 expresado en Log<sup>10</sup>, a partir de las células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, la gráfica representa un ensayo realizado por triplicado. n=3.

En La figura 10, se observa una tendencia a disminuir la concentración del RNA del DENV-2 dosis dependiente, que no alcanza a presentar una diferencia estadísticamente significativa frente al control de infección.

### 3. Evaluar el efecto de la curcumina sobre el sistema ubiquitina-proteosoma en cultivo de células con y sin infección con DENV-2.

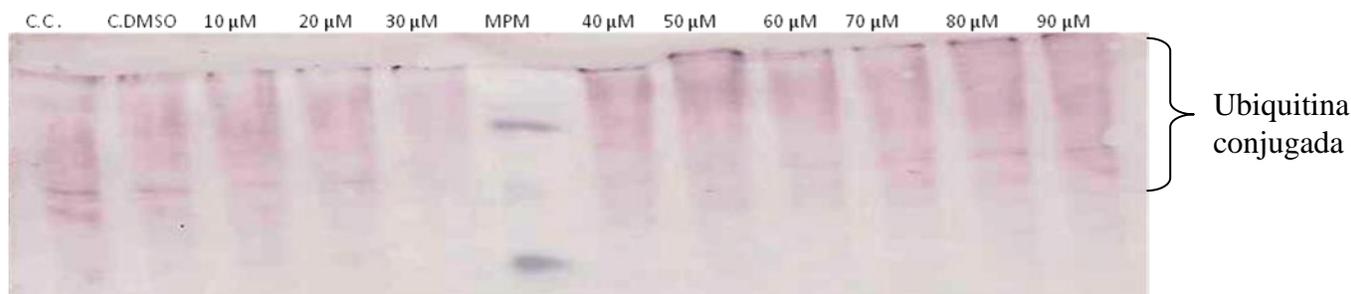


Figura 11a. Western blot, para determinar la presencia de proteínas marcadas con ubiquitina, en células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

C.C: control de células sin infección ni tratamiento, C.DMSO: control de células tratadas con 0,24% DMSO sin infección, 10 µM a 90 µM: células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

En la figura 11a, se observa el western blot que se realizó a las células tratadas por 8 horas con curcumina a diferentes concentraciones, se evidencia un aumento en las proteínas marcadas con ubiquitina a medida que aumenta la concentración de curcumina y se hace más evidente este cambio a partir de la concentración de 40  $\mu\text{M}$ .

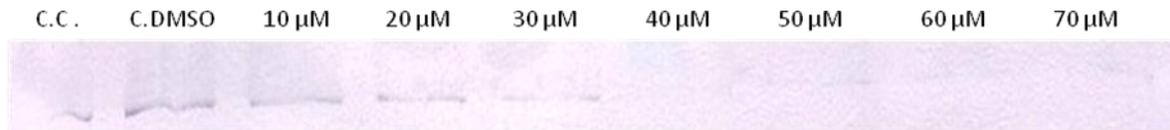
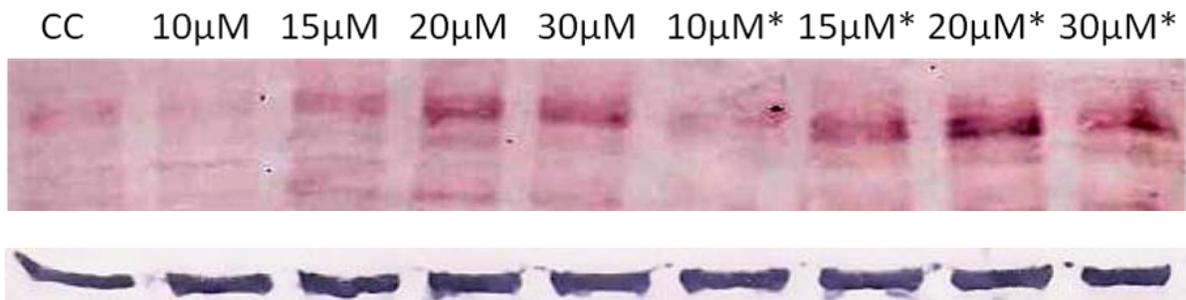


Figura 11b. Western blot para determinar la presencia de ubiquitina libre En células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

C.C: control de células sin infección ni tratamiento, C.DMSO: control de células tratadas con 0,24% DMSO sin infección, 10  $\mu\text{M}$  a 90  $\mu\text{M}$ : células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

La figura 11b, se aprecia, que las concentraciones de ubiquitina libre disminuyen cuando aumenta la concentración de curcumina; esto se explica debido a que, al impedir la función del proteosoma, las proteínas marcadas con ubiquitina se acumulan; por lo tanto no hay recambio de ubiquitina y las concentraciones libres disminuyen.



Beta-actina.

Figura 11c. Western blot, para determinar la presencia de proteínas marcadas con ubiquitina Lys-48, en células infectas con DENV-2 y sin infección, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

C.C: control de células sin infección ni tratamiento, 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina. \* representa los ensayos con células infectadas y tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

La figura 11c muestra las bandas de proteínas marcadas con ubiquitina Lys-48 a partir de células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina. Se evidenció un aumento en la concentración de

proteínas marcadas con ubiquitina Lys-48 en las células con y sin infección, dependiente de la concentración de curcumina utilizada.

Para confirmar si las proteínas marcadas con ubiquitina Lys-48 está en mayor proporción en la célula infectada y tratada con curcumina, se realizó, la cuantificación relativa de esta proteína mediante la técnica de In cell western.

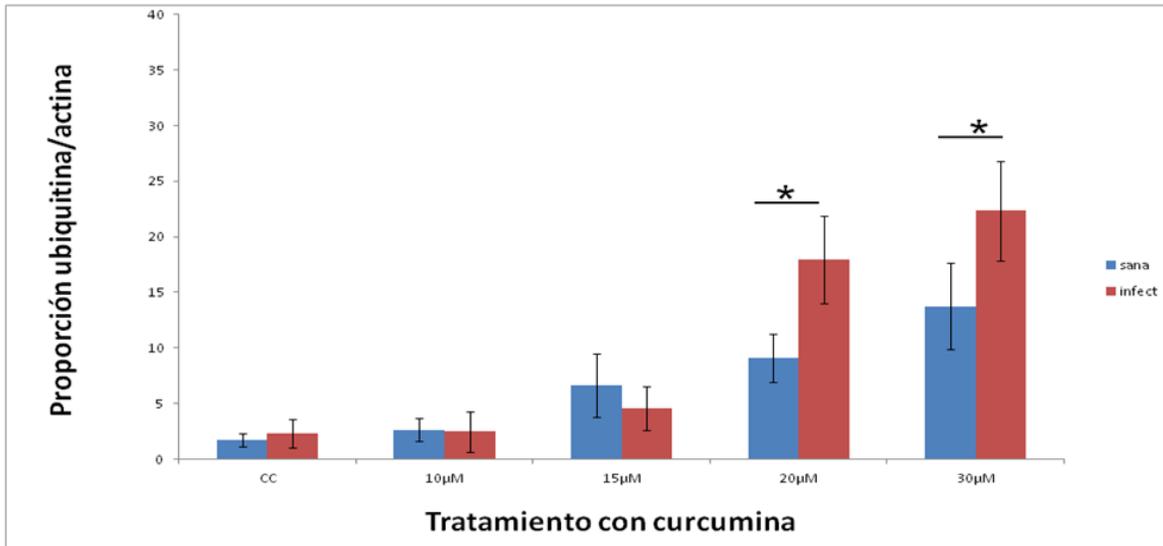


Figura 11d. Cuantificación relativa de las proteínas marcadas con ubiquitina Lys-48 en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

Las barras de color azul representa la media y desviación estándar de la proporción de células marcadas con ubiquitina Lys48/actina, de las células control tratadas 0,24% de DMSO (CC) ó 10 µM, 15 µM 20 µM y 30 µM de curcumina. Las barras de color rojo representa la media y desviación estándar de la proporción de células marcadas con ubiquitina Lys48/ actina, de las células infectadas con DEV-2 tratadas con 0,24% de DMSO (CC) ó 10µM, 15 µM 20µM y 30µM de curcumina. La gráfica representa 3 experimentos por duplicado n=6. \* representa diferencia significativa (P < 0,05)

En la figura 11d se observa que las células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, presentan un aumento en la proporción de las proteínas marcadas con ubiquitina Lys-48, también, se evidenció que este efecto, es dosis dependiente, haciéndose más evidente en las concentraciones de 20 µM y 30 µM en ambos tipos de células. Además, el aumento de la proporción de las proteínas marcadas con Lys-48 es mayor en la célula infectada y tratada con curcumina que en las células sin infección.

Los resultados obtenidos con la prueba de In cell western, corroboran los resultados encontrados mediante la técnica de western blot, donde se evidenció un aumento de las proteínas marcadas con ubiquitina y ubiquitina Lys-48 y una

disminución de la ubiquitina libre dosis dependiente, lo cual confirma que la curcumina produce una inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma como ha sido reportado previamente en la literatura.

Figura 12a

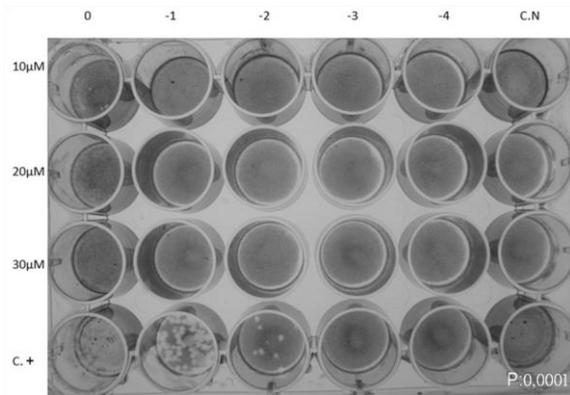


Figura 12b

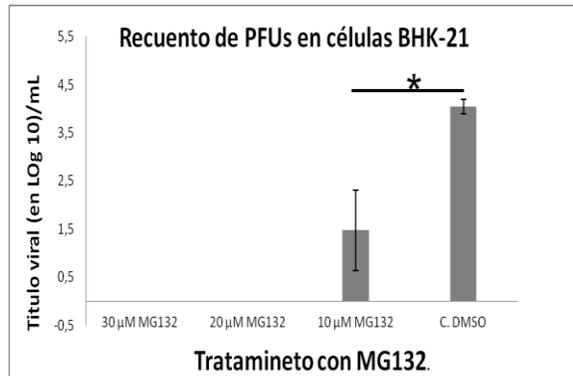


Figura 12. Inhibición en la producción de PFUs en células BHK-21 tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de proteosoma MG132.

C.DMSO: control de células infectadas tratadas con 0,24% de DMSO, 10 µM, 20 µM 30 µM: tratamientos con inhibidor de proteosoma MG132. La figura 9a, representa la técnica de recuento en placa y la figura 9b, representación gráfica de la media y la desviación estándar del recuento de PFUs en Log<sup>10</sup> de 3 experimentos por duplicado n=6. \* representa diferencia significativa (P < 0,05)

Como se observa en la figura 12, las células infectadas a una MOI 5 y posteriormente tratadas con el inhibidor de proteosoma MG132 presentan una disminución en la formación de PFUs frente al control de infección y a la concentración de 10 µM; en las concentraciones de 20 µM y 30 µM no se observan PFUs, estos resultados son similares a los obtenidos cuando se realizan tratamientos con diferentes concentraciones de curcumina.

4. Evaluar el efecto de la curcumina sobre el citoesqueleto de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, en cultivo de células con sin infección con DENV-2.

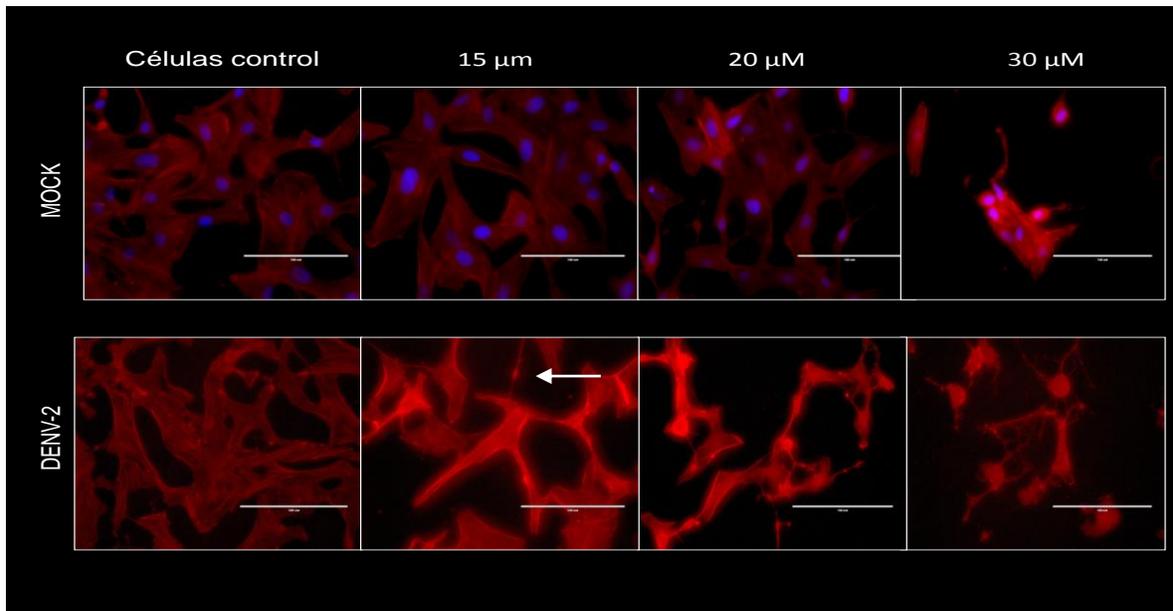


Figura 13a. Evaluación del efecto del curcumina sobre el citoesqueleto de actina en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina por 12 horas.

Mock: células Vero sin infección tratadas con 0, 24% de DMSO, 15 μM, 20 μM, 30 μM tratamiento con curcumina. (Fotos tomadas en el microscopio invertido de fluorescencia EVOSfl® en un aumento de 40X).

Como se observa en la figura 13a, las células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, presentan una morfología normal sin daño aparente del citoesqueleto de actina. Existe un cambio morfológico a nivel del citoesqueleto de actina mas acentuado en las células infectadas y tratadas con curcumina que en los controles tratados sin infección.

En las células infectadas con DENV-2, a partir del tratamiento con 15 μM de curcumina, se observa pérdida de citoesqueleto (flecha blanca), redondeamiento celular y mayor intensidad del marcaje de actina, también se observa, pérdida de las fibras de tensión que se va acentuando en los tratamientos con 20 μM y 30 μM de curcumina.

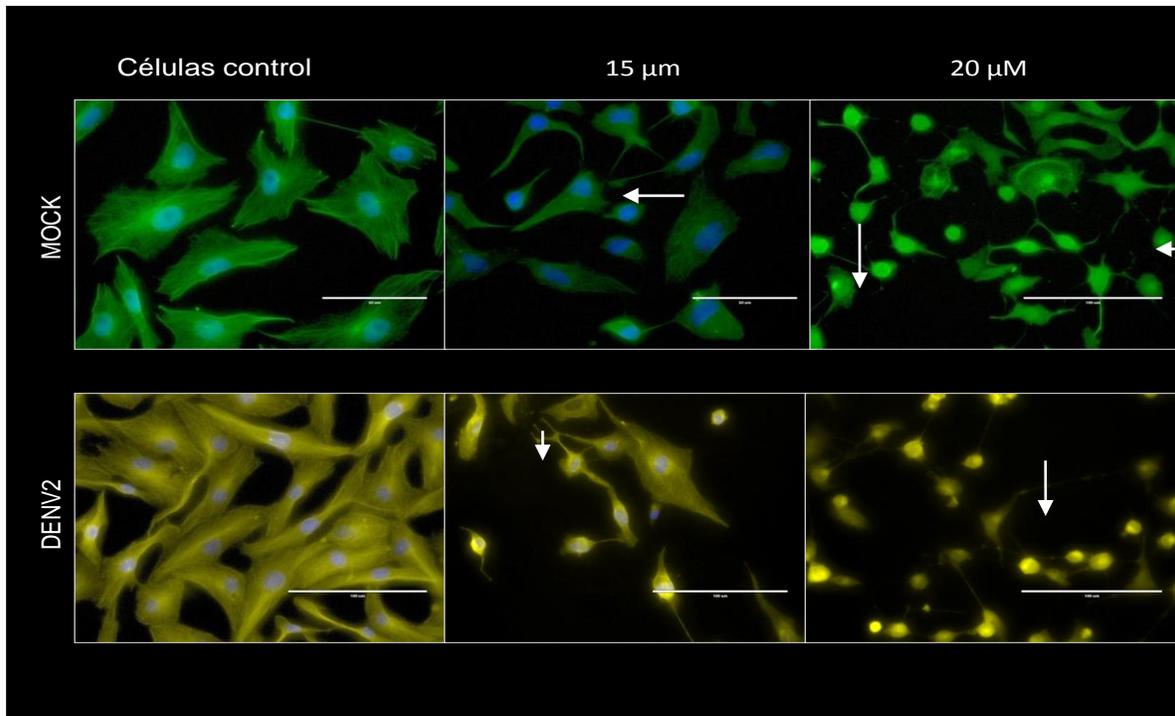


Figura 13b. Evaluación del efecto del curcumina sobre los microtúbulos, en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina por 24 horas.

Mock: células Vero sin infección tratadas con 0, 24% de DMSO, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, tratamiento con curcumina. (Fotos tomadas en el microscopio invertido de fluorescencia EVOSfl® en un aumento de 40X).

Como se observa en la figura 13b, las células Vero presentan un cambio en la morfología dosis dependiente, respecto, al control infectado y sin infectar, también se evidencia una mayor alteración en las células infectadas y tratadas, que en las células solo tratadas con curcumina. En esta figura se aprecia alteración de los microtúbulos, en las concentraciones de 15  $\mu$ M cuando la célula está infectada y este efecto es similar pero en la concentración de 20  $\mu$ M cuando la célula no se encuentra infectada; también se evidencia redondeamiento de las células y mayor intensidad de la tinción a medida que la célula cambia su morfología, además, se observa, pérdida del citoesqueleto (flechas blancas). El efecto observado en las células es más intenso a las 24 horas de tratamiento que a las 12 horas (figura 13a).

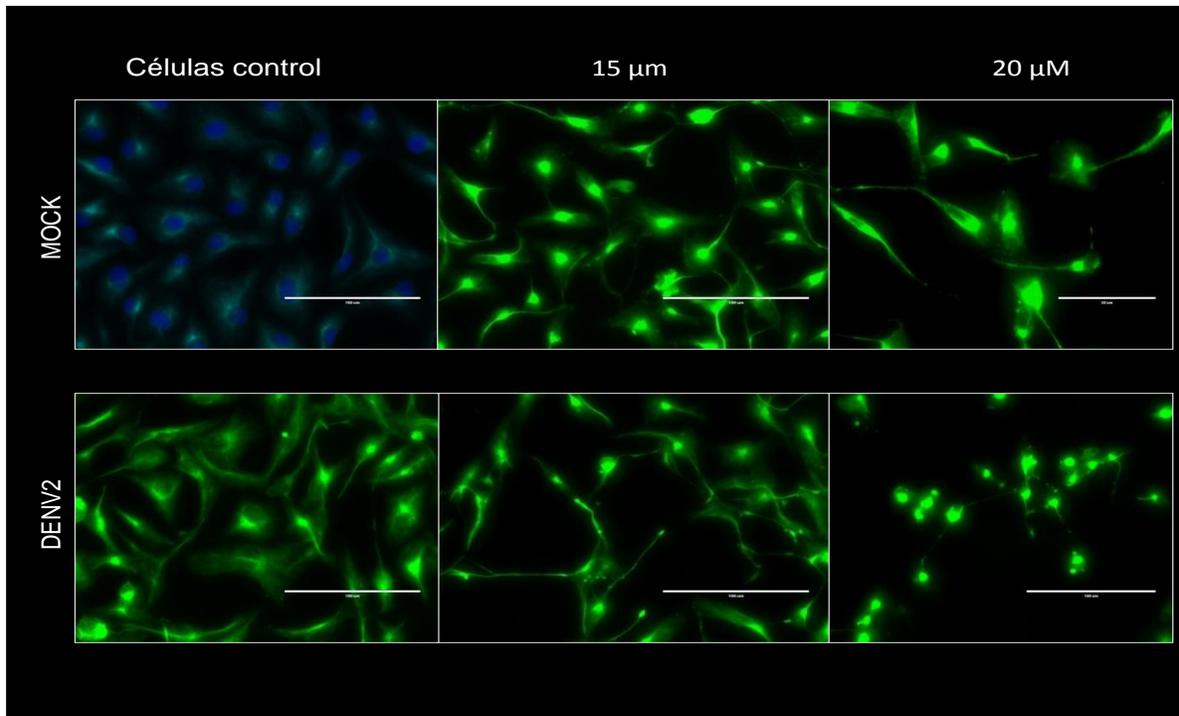


Figura 13c. Evaluación del efecto de la curcumina sobre los filamentos intermedios en las células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con curcumina a diferentes concentraciones por 24 horas.

Mock: células Vero sin infección tratadas con 0, 24% de DMSO, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, tratamiento con curcumina. (Fotos tomadas en el microscopio invertido de fluorescencia EVOSfl® en un aumento de 40X).

Como se observa en la figura 13c, las células Vero presentan un cambio en la morfología dosis dependiente, respecto, al control infectado y sin infectar, también se evidencia una mayor alteración en las células infectadas y tratadas, que en las células solo tratadas con curcumina; este mismo comportamiento se observó en el citoesqueleto de actina y microtúbulos, demostrando que la curcumina posee la capacidad de alterar estas 3 estructuras y que su efecto es dosis dependiente.

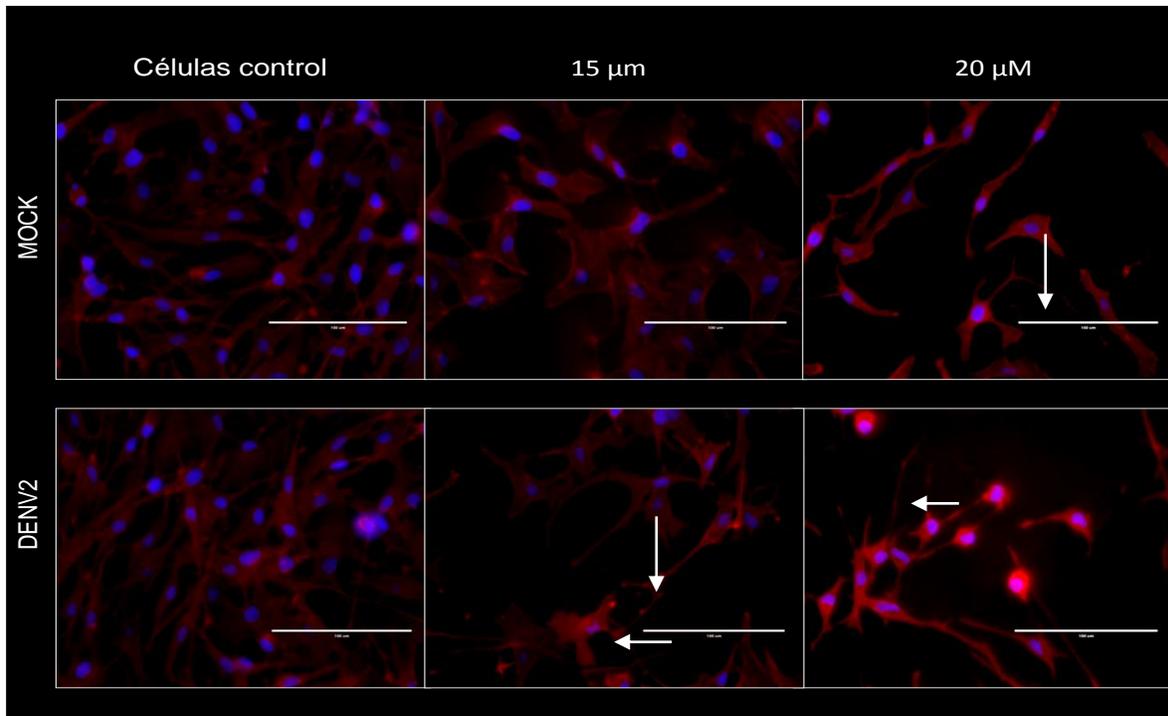


Figura 13d. Alteración en el citoesqueleto de actina en las células BHK-21 infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con curcumina a diferentes concentraciones por 24 horas.

Mock: células Vero sin infección tratadas con 0, 24% de DMSO, 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  tratamiento con curcumina. (Fotos tomadas en el microscopio invertido de fluorescencia EVOSfl® en un aumento de 40X).

Como se observa en la figura 13d, las células BHK-21 infectadas y tratadas con curcumina por 24 horas, presentan una alteración morfológica aparente, respecto al control; se hace evidente pérdida de citoesqueleto en las concentraciones de 15  $\mu\text{M}$ , cuando las células están infectadas y un efecto similar en las células no infectadas en el tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de curcumina.

A medida que aumenta la concentración de curcumina se observa un redondamiento celular, mayor pérdida de las uniones intercelulares y acumulo de actina (flecha blanca).

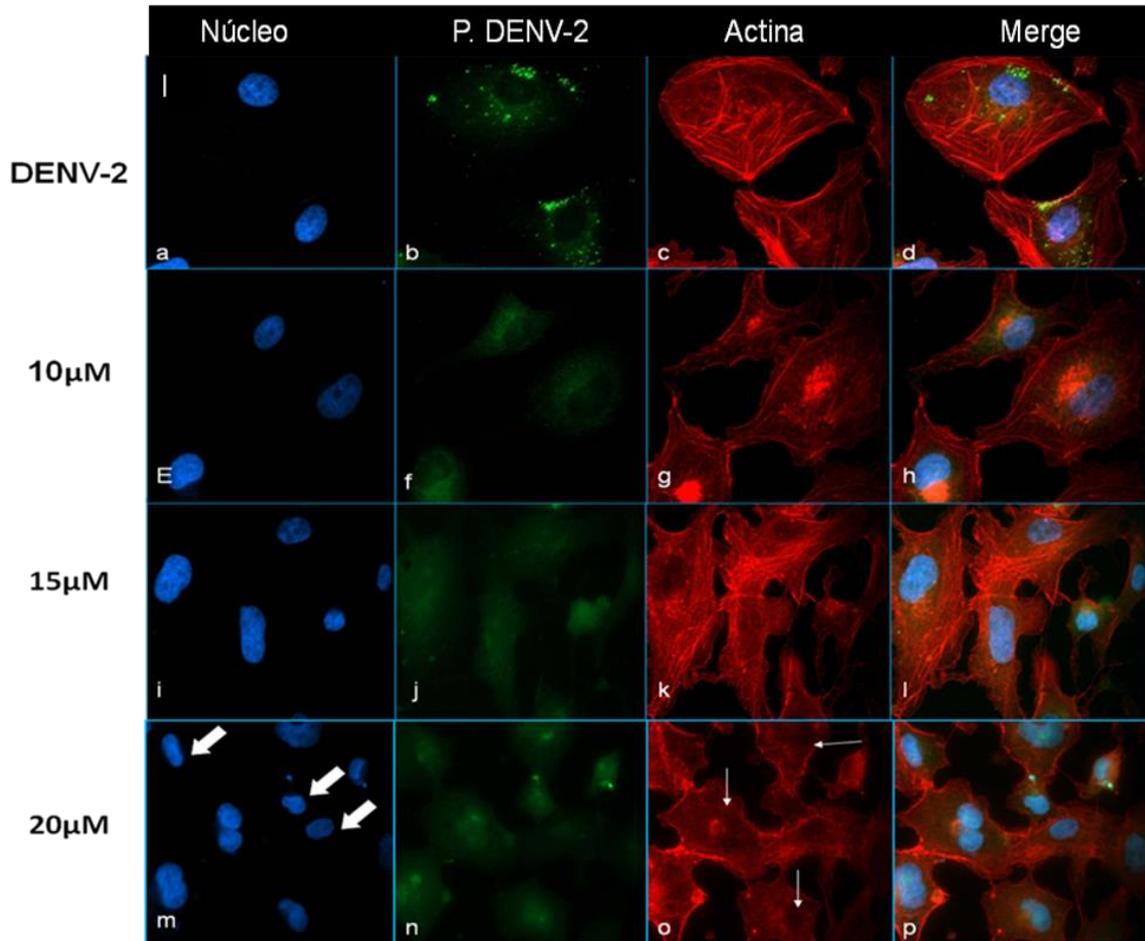


Figura 13el. Células Vero sin infectar, tratadas diferentes concentraciones de curcumina marcadas con actina.

DENV-2, células Vero infectadas y tratadas con 0, 24% de DMSO (a,b,c,y d), 10  $\mu$ M (e, f, g y h), 15  $\mu$ M (i, j, k y l), 20  $\mu$ M (m, n, o y p) tratamientos con curcumina; todas las fotos fueron tomadas 24 horas después del tratamiento con curcumina. (Fotos tomadas en microscopio confocal de disco giratorio marca Olympus® IX-81, aumento 60X).

En la figura 13el se hace evidente un cambio en la morfología celular de manera dosis dependiente de curcumina; en la concentración de 20  $\mu$ M, se evidencia perdida de las fibras de tensión (flechas blancas delgadas) y una mayor condensación nuclear (fechas blancas gruesas).

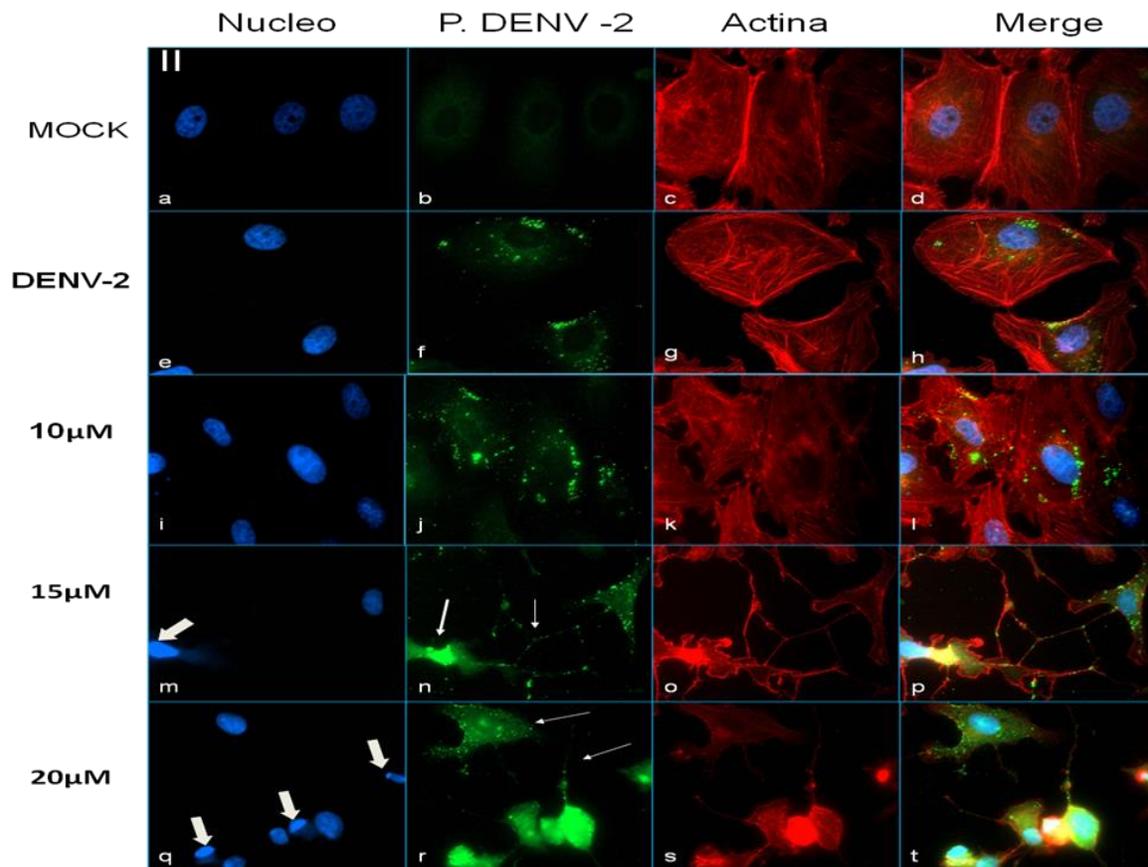


Figura 13eII, células Vero infectadas y tratadas diferentes concentraciones de curcumina, marcadas con actina.

Mock: células Vero sin infección tratadas con 0, 24% de DMSO (a, b, c,y d); DENV-2, células Vero infectadas y tratadas con 0, 24% de DMSO (e, f, g y h); 10  $\mu$ M (i, j, k y l), 15  $\mu$ M (m, n, o y p), 20  $\mu$ M ( q, r, s y t) tratamientos con curcumina. Todas las fotos fueron tomadas 24 horas después del tratamiento con curcumina en el microscopio confocal de disco giratorio marca Olympus® IX-81 con un Aumento de 60X.

En la figura 13eII, se hace evidente que los tratamientos con curcumina generan alteración de la morfología celular de manera dosis dependiente, en las concentraciones de 15  $\mu$ M y 20  $\mu$ M, se observa acumulación de la proteína viral a nivel perinuclear y en los extremos de unión entre las células (flechas blancas), además, de una condensación nuclear.

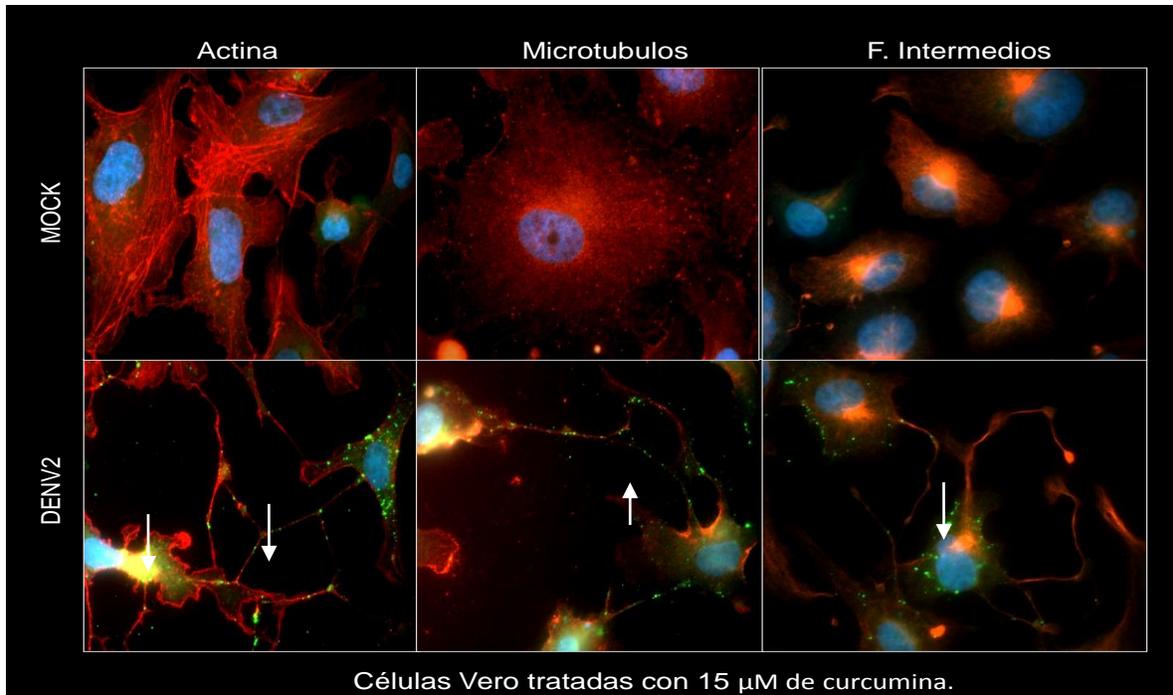


Figura 13f. Alteración del citoesqueleto en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con 15  $\mu\text{M}$  de curcumina y marcadas con actina, microtúbulos y filamentos intermedios.

En la figura 13f, se puede apreciar con gran detalle el cambio morfológico de las células infectadas y tratadas con curcumina, respecto a su control sin infección, además se observa cómo la proteína viral se encuentra atrapada a nivel perinuclear y en las uniones intercelulares (flecha blanca), Cada uno de los marcajes del citoesqueleto (actina, microtúbulos y filamentos intermedios) representan experimentos independientes, lo cual significa que hay reproducibilidad del efecto sobre la célula infectada y tratada con curcumina.

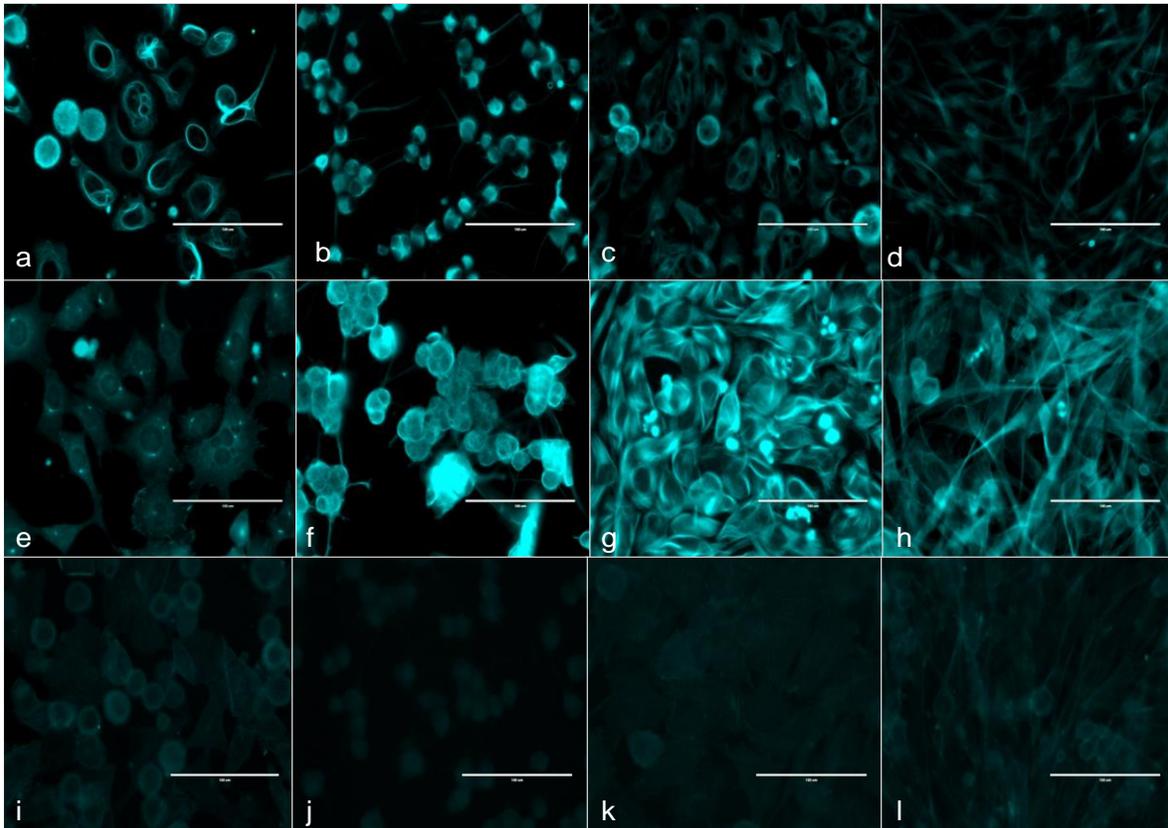


Figura 13g. Cambios morfológicos generados por el tratamiento con: Nocodazole®, Latrunculin®, Paclitaxel®, Phalloidin®, en las células BHK-21.

a, b, c y d células teñidas para filamentos intermedios, tratadas con Nocodazole (a), Latrunculin (b), Paclitaxel (c), Phalloidin (d); e, f, g y h, células teñidas para Microtúbulos, tratadas con Nocodazole (e), Latrunculin (f), Paclitaxel (g), Phalloidin (h); i, j, k y l, células teñidas para actina, tratadas con Nocodazole (i), Latrunculin (j), Paclitaxel (k), Phalloidin (l). (fotos tomadas en el microscopio invertido de fluorescencia EVOSfl® en un aumento de 40X).

Como se observa en la figura 13g, los cambios más drásticos en la morfología celular se presentan en las células tratadas con Latrunculin [desestabilizador de actina (b,f,j)], donde se observa un redondeamiento celular y formación de filamentos entre célula y célula; con estos experimentos no se puede evidenciar si existe alteración en la estructura de los filamentos intermedios o de los microtúbulos en las células tratadas con Latrunculin ya que las células al volverse redondas no permiten visualizar en detalle esta parte del citoesqueleto; muy probablemente, al dañarse los filamentos de actina debido a la falta de polimerización, la célula pierde su arquitectura normal generándose células redondas, sin verse afectadas directamente las otras estructuras del citoesqueleto celular.

El Nocodazole al dañar los microtúbulos, no genera cambios tan drásticos en la morfología celular muy probablemente debido a que la estructura de la actina y de filamentos intermedios se encuentra sin daño aparente, por lo tanto, la célula conserva su morfología. Las moléculas que estabilizan microtúbulos y actina no generaron redondeamiento celular y las células permanecieron con su morfología habitual, debido a que al estabilizarse el citoesqueleto la célula conserva su arquitectura.

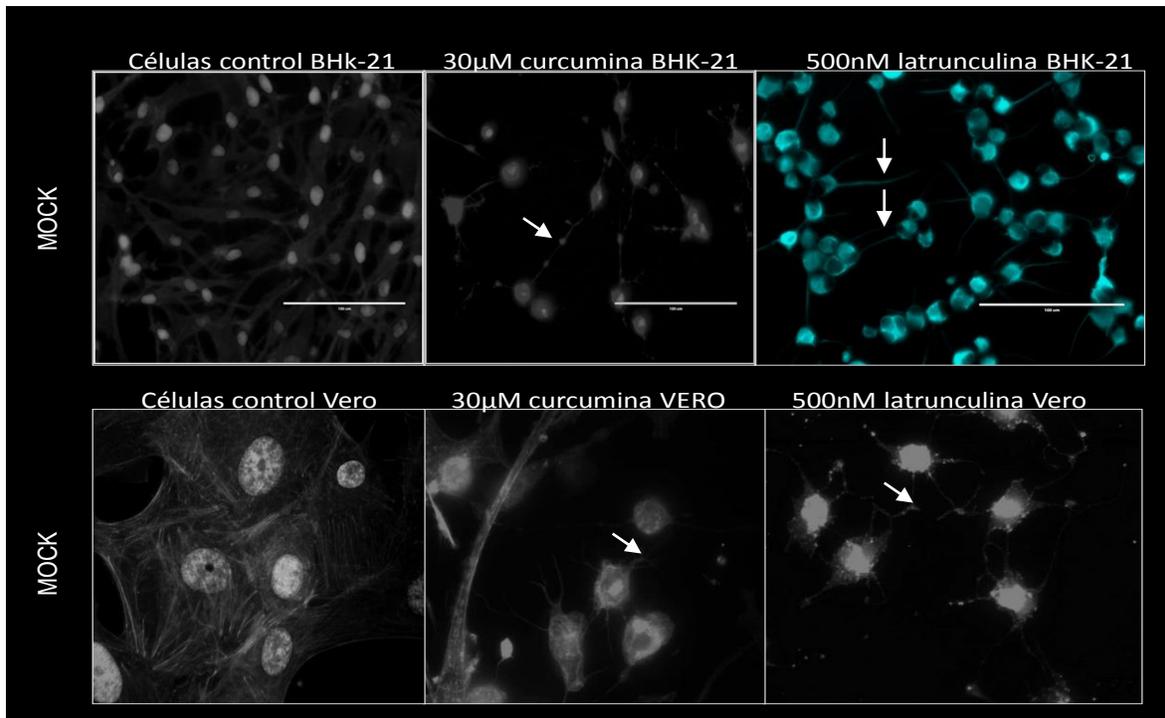


Figura 13h. Comparación en la alteración del citoesqueleto de actina después de realizar el tratamiento con curcumina y Latrunculin en células Vero y BHK-21.

En la figura 13h, se observa el efecto del tratamiento con curcumina a 30µM y de Lantrunculin a 500nM (molécula que desorganiza actina), se puede apreciar un efecto similar entre ambos tratamientos, ya que se observa un redondeamiento de las células, formación de prolongaciones citoplasmáticas, pérdida de fibras de tensión y pérdida del citoesqueleto (flecha blanca); teniendo en cuenta que la Lantrunculin es un desorganizador de actina y presenta un efecto similar al de la curcumina, se postula como un posible efecto de la curcumina sobre la célula, la alteración del citoesqueleto de actina.

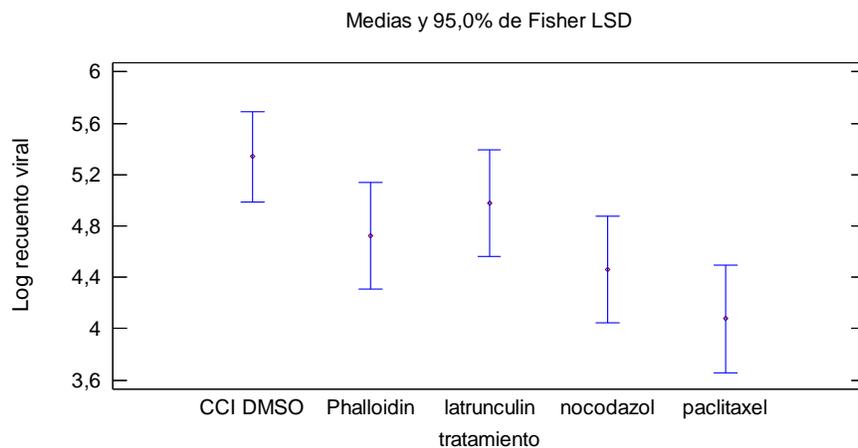


Figura 13i. Gráfica generada por el programa Statgraphic Centurion XV. Versión II®. después de realizar un ANOVA de única vía de los diferentes tratamientos con Nocodazole, Latrunculin, Paclitaxel, Phalloidin.

En la figura 13i, se observa la representación gráfica de la media y su desviación estándar, de los  $\log^{10}$  obtenidos de los recuentos de las PFUs de los diferentes tratamientos realizados con Paclitaxel®, Nocodazole®, Phalloidin®, Latrunculin®, se evidencia una disminución de las PFUs en los tratamientos con Nocodazole y Paclitaxel, frente al controles de células infectadas y tratadas con 0,24 % de DMSO; de acuerdo con la prueba de rangos múltiples existe diferencias significativas entre el control de infección y estos tratamientos y no existe diferencia entre el control de infección y los tratamientos con Phalloidin y latrunculin.

**5. Evaluar la presencia de curcumina en la membrana celular y el retículo endoplasmático de células tratadas con esta molécula.**

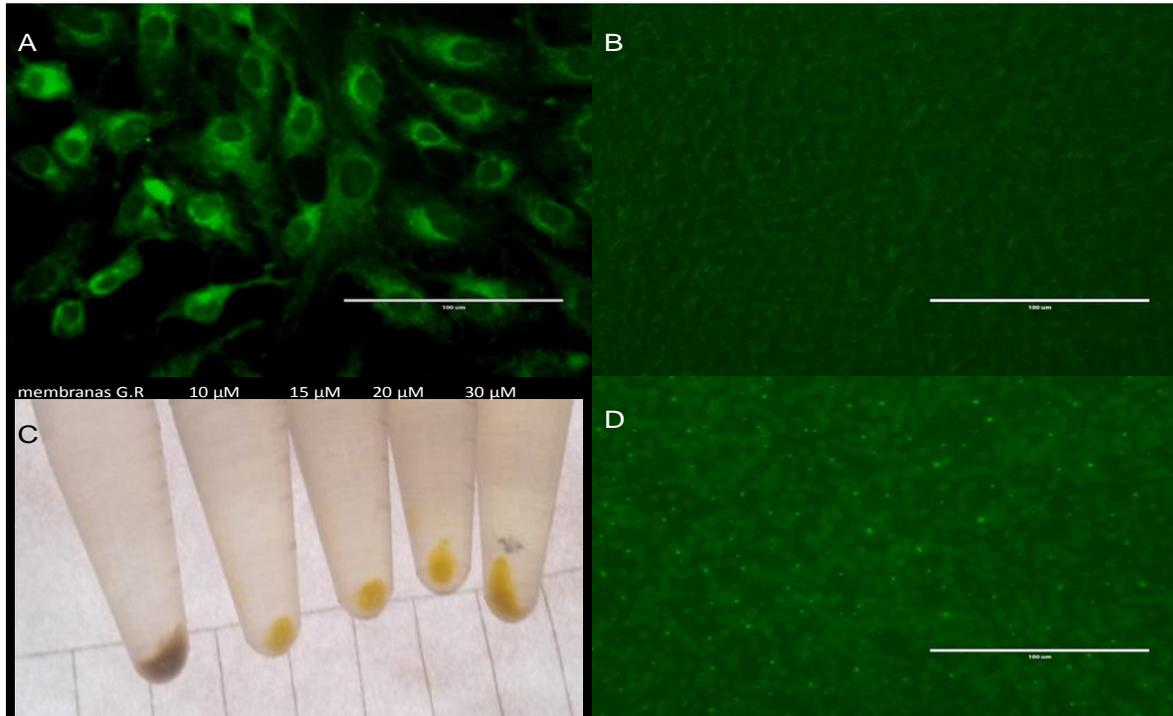


Figura 14a. Evaluación de la retención de la curcumina en células Vero, glóbulos rojos y membranas de glóbulos rojos.

Panel A, células Vero tratadas con 30  $\mu\text{M}$  de curcumina por 1 h. panel B, glóbulos rojos sin tratamiento con curcumina; panel C, ensayo de retención de curcumina en membranas de glóbulos rojos tratadas con diferentes concentraciones del colorante; panel D, glóbulos rojos tratados con 20  $\mu\text{M}$  de curcumina, las fotos de los panel A, B, C, fueron tomadas en microscopio fluorescente Evosfl® en un aumento de 40X.

En la figura 14a en el panel A, se aprecian células fluorescentes verdes de mayor intensidad a nivel perinuclear; en el panel B y D, se muestra el control de glóbulos rojos, el cual no presenta fluorescencia (B), y los glóbulos rojos fluorescentes cuando se realizó tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de curcumina (D).

Para poder evidenciar si la curcumina quedaba retenida en la hemoglobina o en la membrana celular, se realizó, un lisado de los glóbulos rojos (metodología 2.7) y se observó que las membranas celulares retenían la curcumina de manera dosis dependiente, debido a que, se presentó un color amarillo más intenso de acuerdo a la concentración utilizada del colorante (C). El control permaneció de un color café.

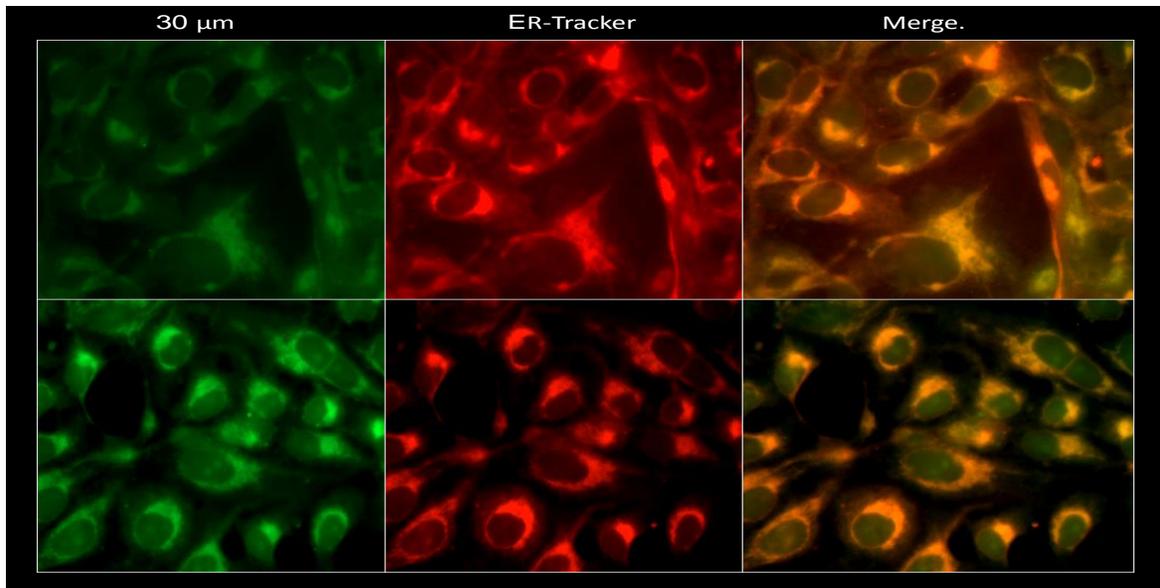


Figura 14b. Determinación de la retención de la curcumina a nivel del retículo endoplasmático.

30  $\mu\text{M}$ : tratamiento con curcumina; ER Tracker: molécula para marcaje fluorescente rojo de retículo endoplasmático; Merge: unión de foto tomada a las células con marcaje de curcumina (30  $\mu\text{M}$ ) y la foto tomada de la misma célula tratada con marcaje de reticuloendoplasmático. (Fotos tomadas con microscopio confocal de disco giratorio marca Olympus® IX-81. Aumento 60X)

En la figura 14b se observa la fluorescencia verde producida por las células tratadas por 1 h con 30  $\mu\text{M}$  de curcumina, en la cual se hace evidente la morfología celular y una mayor fluorescencia a nivel perinuclear, en ese mismo campo se tomo la fluorescencia roja emitida por las células que fueron marcadas previamente (antes del tratamiento con curcumina) con ER tracker®, el Merge, representa la unión de las dos fotos anteriores, donde se co-localiza ambas fluorescencias, lo cual indica que la curcumina puede acumularse a nivel de este orgánulo.

**6. Determinación de la activación del estrés del retículo endoplasmático en células Vero infectadas y sin infectar con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.**

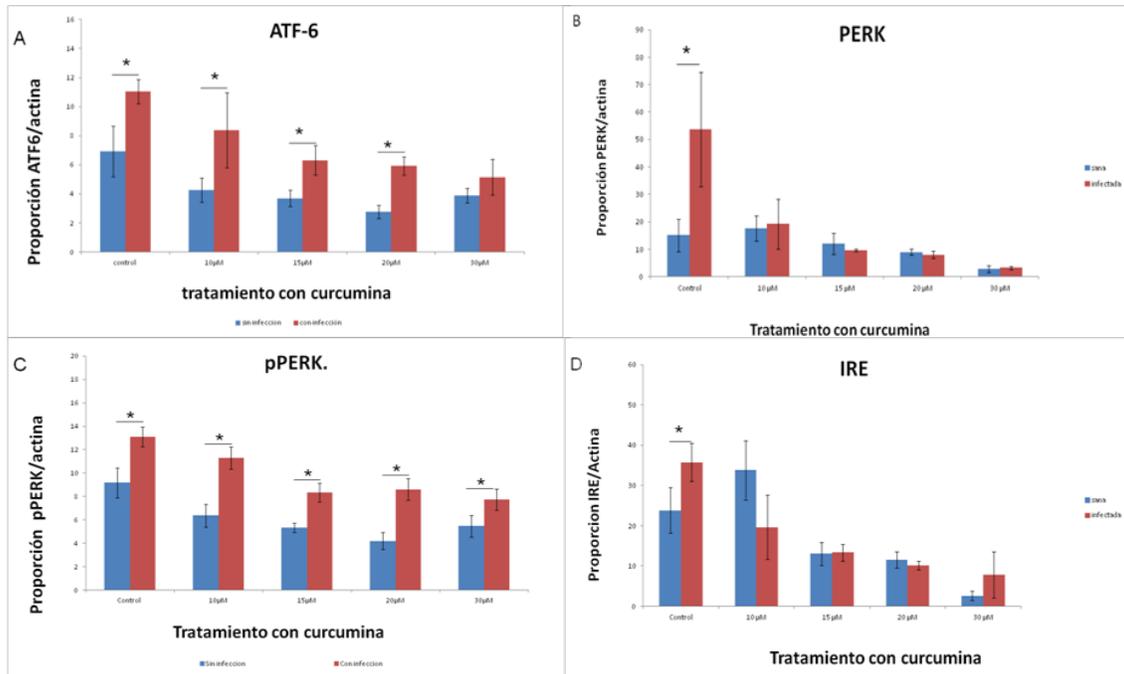


Figura 15. Cuantificación relativa de las proteína ATF-6, PERK, pPERK e IRE, por el método de In cell western, en células Vero.

Control, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM tratamientos con curcumina. Las barras rojas representan la media y desviación estándar de la proporción de ATF-6, PERK, pPERK e IRE / actina, de las células infectadas tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, las barras azules representan la media y desviación estándar de la proporción de ATF-6, PERK, pPERK e IRE / actina, de las células sin infección tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, las gráficas representan 2 experimentos por triplicado, n=6. \* representa diferencia significativa (p<0,05).

En la figura 15 se evidencia una disminución en la concentración de la proteína ATF-6, PERK, pPERK e IRE en las células infectadas y tratadas con curcumina, frente al control de células infectadas, este mismo patrón se hace evidente en las células sin infección tratadas con curcumina en las proteínas ATF-6, pPERK e IRE. En este grupo de células, la proteína PERK disminuye significativamente solo en los tratamientos de 20 µM y 30 µM con curcumina.

## 7. Determinar la generación de apoptosis en células infectadas con DENV-2 y tratadas con curcumina.

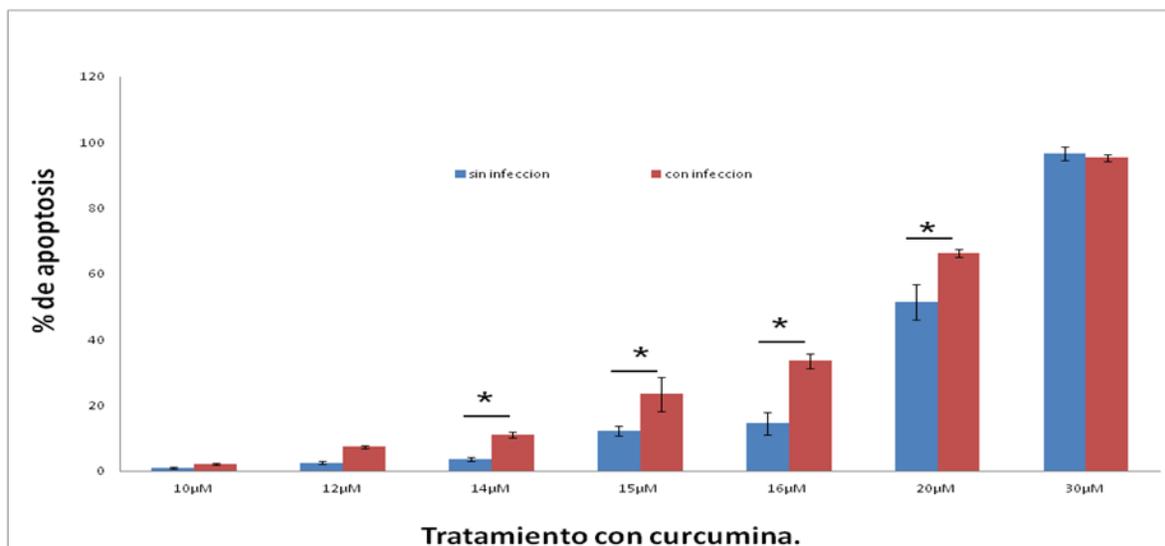


Figura 16a. Representación gráfica del porcentaje de células marcadas con anexina V en las células infectadas y sin infección con DENV-2, tratadas con diferentes concentraciones de curcumina.

10 µM, 12 µM, 14 µM, 15 µM, 16 µM, 20 µM, 30 µM tratamiento con curcumina, las barras rojas representan la media y la desviación estándar del porcentaje de células con marcaje de anexina V de las células infectadas tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, las barras azules representan la media y la desviación estándar del porcentaje de células marcadas con anexina V de las células sin infección tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, la gráfica representa 4 experimentos por duplicado, n=8. \* representa diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

En la figura 16a, se evidencia el aumento de las células marcadas con anexina V de pendiente de la dosis de curcumina, siendo este efecto mayor en la célula infectada. El mayor porcentaje de las células marcadas con anexina V en el grupo infectado, puede ser debido a que la infección viral genera un aumento en la síntesis de proteínas virales lo cual produce estrés del retículo endoplasmático (figura 15), además la curcumina afecta la función del sistema ubiquitina-proteosoma y evita la degradación de proteínas por este sistema (figura 11a, b, c y d) y disminuye las proteínas de respuesta al estrés del retículo endoplasmático (figura 15 a, b, c y d), todo lo anterior podría generar mayor estrés del retículo

endoplasmático en menor tiempo y al no poderse revertir este efecto, se induce apoptosis celular, por otra parte, la alteración del citoesqueleto, también podría desencadenar apoptosis

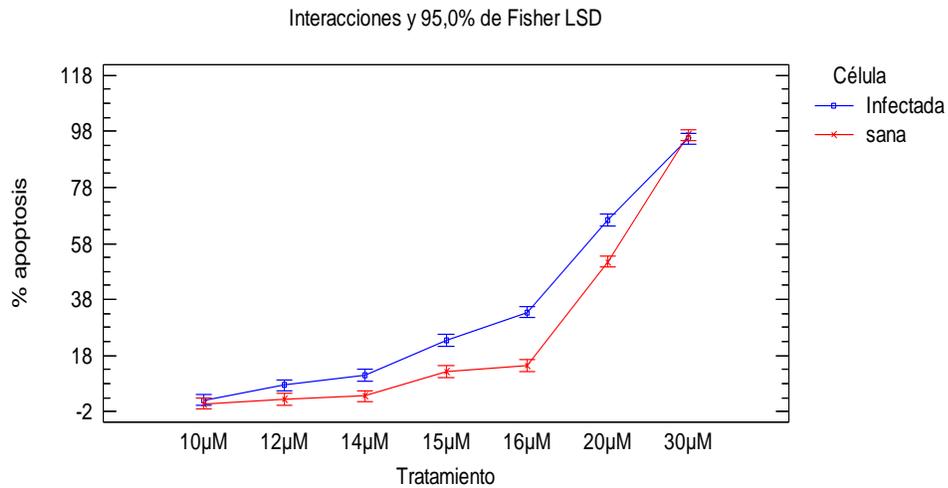


Figura 16b. Gráfica de interacción generada por el programa Statgraphic Centurion XV. Versión II, después de realizar un ANOVA de doble vía al porcentaje de células que presentan marcaje con anexina V en las células infectadas y sin infectar con DENV-2.

10 µM, 12 µM, 14 µM, 15 µM, 16 µM, 20 µM, 30 µM tratamientos con curcumina, la línea azul representan las células infectadas tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, la línea rojas representan las células sin infección tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, la gráfica representa 4 experimentos por duplicado, n=8.

Como se evidencia en el gráfico de interacción (figura 16b), existe una diferencia en el porcentaje de células marcadas con anexina V, en el grupo infectado y no infectado ambos tratados con diferentes concentraciones de curcumina, lo cual significa que el estado de la célula (infectada y sin infectar) y la concentración de la curcumina, tiene un efecto sobre el porcentaje de apoptosis. En los tratamientos con 10 µM y 30 µM no se evidencia diferencia significativa entre las células infectadas y sin infectar, de acuerdo con la prueba de rangos múltiples (datos no mostrados).

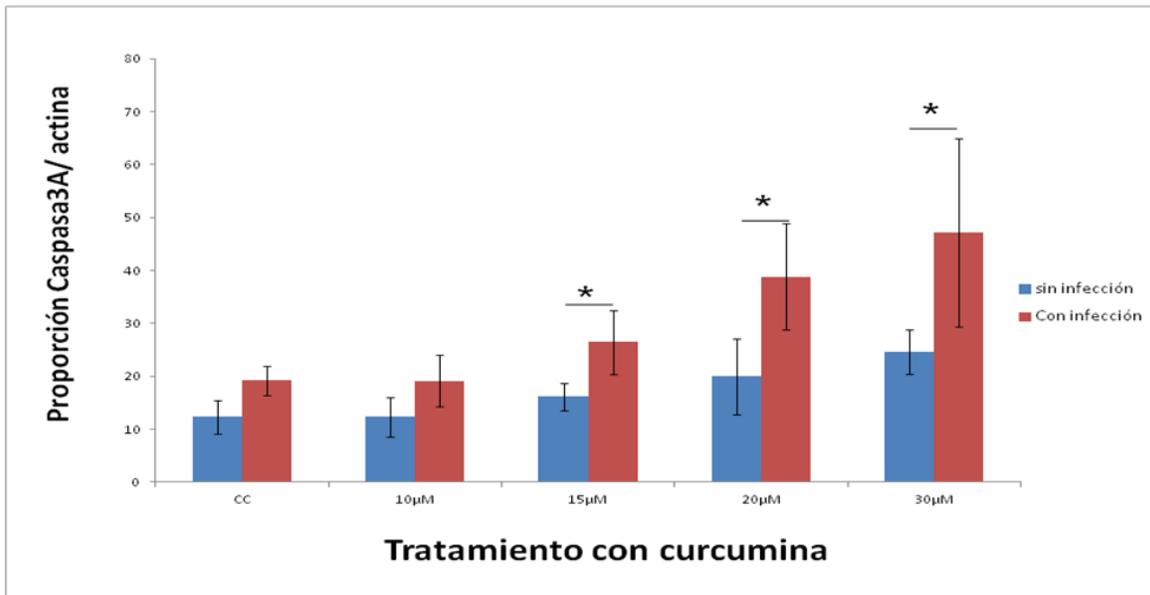


Figura 16c. Cuantificación relativa de caspasa 3 activa en células Vero.

CC: control células, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM tratamientos con curcumina, las barras rojas representan la media y desviación estándar de la proporción de caspasa 3 activada/ actina, de las células infectadas tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, las barras azules representan la media y la desviación estándar de la proporción de caspasa 3 activada/ actina, de las células sin infección tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, la gráfica representa 2 experimentos por triplicado, n=6. \* representa diferencia significativa (p<0,05).

En la figura 16c existe un aumento de la caspasa 3 activa, dosis dependiente, existiendo una diferencia significativa en los tratamientos con curcumina de 15 µM, 20 µM y 30 µM entre las células infectadas y sin infectar.

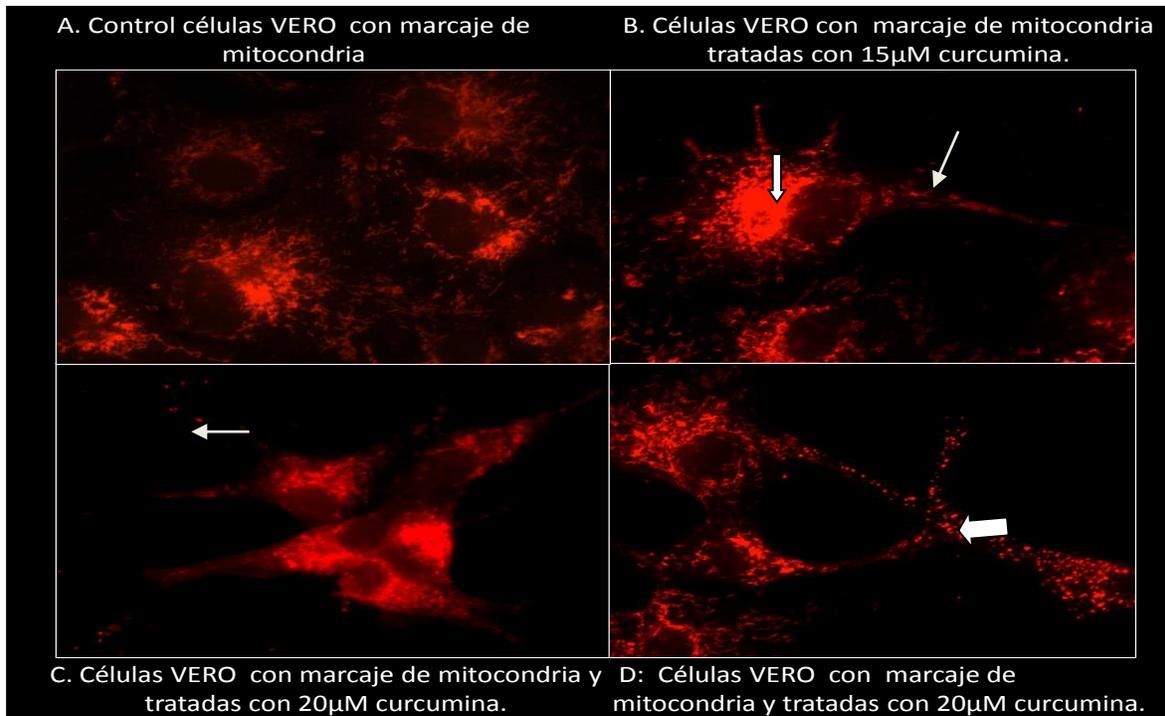


Figura 16d. Células Vero transfectadas con plasmido mKate-mito con marcaje para mitocondria tratadas con diferentes concentraciones de curcumina por 24 h.

En la figura 16d se observan células Vero sin tratamiento y con tratamiento con diferentes concentraciones de curcumina, en el tratamiento de 15  $\mu\text{M}$ , se genera prolongaciones del citoplasma en algunas células donde se encuentran las mitocondrias retenidas (flecha blanca delgada), también se observa mayor acumulo de mitocondrias a nivel perinuclear (flecha blanca gruesa); en las células tratadas con 20 $\mu\text{M}$  de curcumina se evidencia además de la prolongación del citoplasma, redondeamiento de la célula y la acumulación perinuclear de las mitocondrias y perdida de algunas de ellas, panel c, (flecha blanca delgada). La degeneración en la estructura de la mitocondria, al pasar de una forma alargada tipo bacilo, a pequeños puntos, se observa en el Panel D (flecha blanca gruesa)

Estos resultados permiten afirmar que el tratamiento con curcumina genera alteración en las mitocondrias, lo cual podría estar relacionado con la generación de apoptosis (figura 16a) y aumento en la expresión de caspasa 3 activada (figura16c).

## VII. Discusión.

La curcumina es un pigmento amarillo (diferuloylmetano) que se extrae del rizoma de la cúrcuma longa<sup>1,2</sup> se han reportado investigaciones sobre su efecto antitumoral, inmunomodulador, anticancerígeno, antifúngico, antiparasitario y antiviral<sup>3-17</sup>. Para poder realizar estos estudios, es necesario conocer las concentraciones más altas que no general daño a la célula, cuando se trabaja con líneas celulares “sanas” ó la concentración mínima de la molécula, que inhibe el crecimiento de las células tipo cáncer. En este trabajo se utilizaron dos tipos celulares: BHK-21 y Vero, las cuales se han utilizado en el modelo de dengue, por lo tanto se determinó la concentración más alta de curcumina que no alterara la viabilidad celular, para ello utilizamos 3 métodos diferentes: tinción con tripan azul, viabilidad medida con rezaurin y viabilidad medida con MTT. Encontramos que los 3 métodos reportaron una viabilidad alrededor de la concentración de 30  $\mu\text{M}$  en las primeras 24 h; pero cuando se midió esta viabilidad por el método de MTT a las 48 h, se encontró una disminución drástica de esta, en las concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ , pasando del 83 % a las 24 h al 55 % a las 48 h en la concentración de 20  $\mu\text{M}$ ; y del 77 % a las 24 h al 16 % a las 48 h en la concentración de 30  $\mu\text{M}$ , (figura 3c); cuando se realizó la medición de apoptosis por citometría, se obtuvo, un marcaje con anexina V del 56 % y 98 % en las concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  respectivamente (figura 16a), lo cual era poco concordante con el ensayo de MTT a las 24h y mas concordante con este ensayo a las 48h. Se ha reportado que la técnica de anexina V y la medición por citometría es más sensible y específica para cuantificar la muerte celular programada, pero no se esperaba una discrepancia tan alta frente al método de MTT en las primeras 24 h; por lo tanto, se decidió realizar un nuevo ensayo de viabilidad por el método de MTT para poder visualizar las células; Se observó células redondas que producían cristales de formazan (anexo 2), lo cual nos explicó porque a las 24 h se encontraban porcentajes de viabilidad alto, por otra parte, el ensayo de apoptosis, nos mostró que estas células a pesar de ser metabólicamente activas ya se encontraban en apoptosis, por lo tanto a las 48h ya habían muerto estas células y la viabilidad celular disminuía.

Ulukaya en el 2008, reportó que las técnicas utilizadas para evaluar la viabilidad celular, deben ser elegidas de acuerdo con el tipo de célula y el tipo de molécula a utilizar, especialmente si se utilizan células tipo cáncer; este mismo autor, reportó que el método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide), es uno de los más utilizados para evaluar la viabilidad celular, pero, que puede presentar valores de viabilidad mayor que los obtenidos por otros métodos, especialmente en el modelo de cáncer<sup>69</sup>.

En este estudio se observó, que a pesar de tener cambios morfológicos grandes en la célula, este puede seguir produciendo los cristales de formazan (anexo 2), lo cual indica que la deshidrogenasa mitocondrial continua realizando su función, a pesar de que la célula está alterada, también, los ensayos realizados sobre células con marcaje de mitocondria tratadas con curcumina, mostraron que una misma célula puede tener mitocondrias con morfología normal y alterada al mismo

tiempo; por lo tanto, si el cambio en la morfología de la mitocondria está relacionada con la función, existiría, una compensación en la función de estos orgánulos, ya que algunas estarían alteradas y otras no (figura 16d).

Se ha reportado que los extractos de cúrcuma longa y curcumina poseen la capacidad de alterar la infección de diferentes tipos de virus "in vitro" que incluyen: Coxsackie, Hepatitis B, Hepatitis C, herpes simplex, HIV and encefalitis japonesa, influenza entre otros<sup>9-17</sup>. La inhibición en la formación de placas de virus envueltos incluido el virus dengue ha sido evidenciada recientemente por Chen T Y y colaboradores en el 2013; ellos reportaron concentraciones citotóxica en células Vero de 30  $\mu\text{M}$ , iguales a las encontradas en este estudio, además realizaron tratamientos con 10  $\mu\text{M}$  curcumina, antes durante y después de la infección con DENV-2, JEV (virus de encefalitis japonesa) o virus de la influenza y observaron que el tratamiento previo a la infección y el tratamiento durante la infección, reducían la formación de placas en todos virus, pero este efecto no se presentaba cuando las células eran infectadas antes del realizar el tratamiento con curcumina, ellos concluyen que la curcumina afecta la envoltura viral y por lo tanto se afecta la entrada del virus a la célula<sup>17</sup>. Resultados similares fueron obtenidos en este estudio, ya que se encontró recuentos por debajo de 10 PFUs, en los tratamientos con 10  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$  de curcumina, previos a la infección y no se observaron PFUs en la concentración de 20  $\mu\text{M}$  (figura 9); lo cual indica que existe una alteración dosis dependiente en la entrada de virus o en el ciclo viral. Los resultados obtenidos en este estudio, no permiten asegurar que el efecto de la curcumina es directamente en la entrada del virus, debido a que cuando se realizó el recuento de PFUs a las 24 h, 48 h, 72 h después de la infección, encontramos PFUs en todos los sobrenadantes evaluados y estos recuentos aumentaron tiempo dependiente, (figura 9); por lo tanto se puede afirmar que el virus si entró en la célula. Esta discrepancia frente al estudio de Chen T Y et al, puede deberse al tipo de célula utilizada para realizar la técnica de recuento en placa, que en este caso fue células BHK- 21, a las cuales se les han reportado obtención de mayores títulos virales frente a las células LLCMK2<sup>70</sup>.

Por otra parte, estos mismos autores (Chen T Y), reportaron que tratamientos con 10  $\mu\text{M}$  de curcumina posteriores a la infección, no afectaban la formación de partículas virales; por el contrario, este estudio demostró que tratamientos con 10  $\mu\text{M}$  curcumina disminuían un  $\text{Log}^{10}$  frente al control de células infectadas, además, no se encontró PFUs en los tratamientos con concentraciones mayores a 10  $\mu\text{M}$ . Nuevamente, el tipo de célula utilizado para realizar la técnica de recuento en placa podría estar afectando los resultados, además, estos autores, no reportaron el recuento exacto de PFUs en su investigación.

También es importante resaltar, que mediante microscopia confocal, se observó, una acumulación de la proteína viral, a nivel perinuclear y pérdida de citoplasma celular con estas proteínas, cuando se realizó tratamientos con 15  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  curcumina por 24 h (figura 10f), asimismo, se evidenció, una disminución de la proteína viral de manera dosis dependiente del tratamiento con curcumina (figura 7); lo cual confirma que la curcumina afecta la síntesis de proteína viral, aunque este efecto no sea total. Por otra parte, no se observó una disminución significativa

de la concentración de RNA viral, lo cual podría indicar que la curcumina no afecta la replicación del RNA viral (figura 10).

También se evidenció una disminución en la formación de PFUs, dosis dependiente de curcumina, cuando las células fueron tratadas por 24 h (figura 4 y 5) y un aumento de estas, 24 h y 48 h después de retirar el colorante (figura 8), de igual manera, se observó un restablecimiento de la morfología y la monocapa celular después de retirar la curcumina (anexo 3); por lo tanto, estos resultados permite afirmar que el efecto de la curcumina sobre la infección con DENV-2 depende de la dosis utilizada y que este efecto es reversible.

En la literatura consultada no se encontraron artículos que exploren estos aspectos (concentración de proteína viral, cuantificación de RNA viral, alteración del citoesqueleto y morfología celular, recuento de PFUs a diferentes tiempos después de eliminar el tratamiento) en un modelo de infección por dengue tratado con curcumina.

Algunos estudios han demostrado la capacidad que posee la curcumina de acoplarse a las membranas lipídicas y se ha postulado un posible efecto sobre la fluidez y la alteración de estas estructuras. Se ha evidenciado que la curcumina puede unirse a las membranas de forma similar al colesterol<sup>71</sup>; también se ha reportado la unión a la superficie (capa externa) de la membrana celular cuando se utilizan bajas concentraciones de curcumina y unión transmembrana a altas concentraciones<sup>72,73</sup>. En esta investigación se pudo comprobar que la curcumina se unía a las membranas de los glóbulos rojos de manera dosis dependiente (figura 14a) y que a concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  se encontraba Co-localizada en el retículo endoplasmático (figura 14b), estos datos son importantes debido a que el efecto de la curcumina sobre la membrana celular y el retículo endoplasmático podría afectar la entrada viral (Chen T Y), la síntesis proteica (figura 7) y la liberación de las partículas virales (figura 13f).

Respecto a la inhibición del proteosoma, cuando se realiza tratamientos con curcumina, varios estudios han demostrado este efecto en modelos de cáncer<sup>25</sup> y también en modelos virales<sup>14,16</sup>. Se ha evidenciado que la curcumina puede afectar diferentes moléculas del sistema ubiquitina proteosoma que incluye: inhibición de la actividad proteasa, debido a que el carbono carbonilo de la curcumina, interactúa directamente con el residuo de treonina amino terminal de la subunidad 26S del proteosoma celular<sup>27</sup>, inhibición de la enzima ubiquitin isopeptidasa, la cual es responsable de la eliminación de la ubiquitina en las proteínas en el complejo 19S del proteosoma; también, se ha demostrado que la inhibición de esta enzima estaba relacionada con la inducción de apoptosis<sup>26</sup>. De igual manera, Si X y colaboradores en el 2007, en trabajos realizados con coxsackie virus demostraron que parte de la actividad antiviral está relacionada con la inhibición del complejo ubiquitina-proteosoma; debido a la inhibición de la actividad del proteosoma 20S y la actividad deubiquitinante celular por inhibición de las enzimas responsables de este proceso y aunque no identifican estas enzimas, demostraron un aumento en las proteínas ubiquitinizadas en el citoplasma celular<sup>14</sup>, observaciones similares fueron realizadas por Duckta y colaboradores en el 2009, los cuales reportaron que la inhibición en la formación

de partículas infecciosas del virus de encefalitis japonesa es debido a la alteración en la función del sistema ubiquitina proteosoma, ellos evidenciaron que tratamientos entre 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  con curcumina, producen un aumento de las proteínas marcadas con ubiquitina y una disminución de la ubiquitina libre<sup>16</sup>. En el modelo celular utilizado en esta investigación encontramos aumento en la concentración de las proteínas marcadas con ubiquitina (figura 11a), aumento del marcaje específico para degradación por el proteosoma, ubiquitina Lys-48, (figura 11c) y disminución de la ubiquitina libre (figura 11b); también, se observó que estas proteínas se aumentaban en mayor proporción en las células infectadas y tratadas con curcumina (figura 11c y 11d), además, este efecto era dependiente de la dosis de curcumina utilizada (figura 11a, b, c, d). Estos resultados son concordantes con los estudios previamente relacionados, por lo cual se puede asegurar que en este modelo celular, la curcumina altera la función del proteosoma y esta alteración está relacionada con la inhibición de la formación de placas; ya que se demostró que el tratamiento con concentraciones 10  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$  con el inhibidor de proteosoma MG132, disminuyó la formación PFUs de manera dosis dependiente (figura 12), similar a lo ocurrido cuando se realizan tratamientos con diferentes concentraciones de curcumina (figura 4 y 5); resultados similares, fueron obtenidos por Fink et al en el 2007; quienes determinaron, que el tratamiento con los inhibidores del proteosoma MG132 y ALLN {N-[N-(N-Acetyl-L-leucyl)-L-leucyl]-L-norleucine} en células HepG2 infectadas con DENV, disminuyó un 50% la replicación viral, además, demostraron que estas células cuando son infectadas con DENV-2, activan la expresión de genes relacionados con el sistema ubiquitina-proteosoma<sup>74</sup>, de igual manera, Kanyala et al 2010, utilizando la técnica de electroforesis en dos dimensiones e identificación de las proteínas por espectrometría de masas, encontraron que células endoteliales primarias (HUVECs) infectadas con DENV-2 presentaban una expresión de proteínas relacionados con el sistema ubiquitina-proteosoma, además, demostraron que la inhibición de la enzima responsable de la activación de ubiquitina (UBE1) con un inhibidor específico UBEI-41, disminuyó la formación de PFUs y los niveles de las proteínas E y NS1 del virus dengue<sup>75</sup>. Por su parte, Nag y Finley, 2012, encontraron una inhibición en la producción de PFUs en varios flavivirus incluido el Dengue, cuando inhibieron la enzima UBE1 (enzima responsable de la de-ubiquitinización de las proteínas antes de ser degradadas por el proteosoma) con el inhibidor IU1 (1-[1-(4-fluorophenyl)-2,5-dimethylpyrrol-3-yl]-2pyrrolidin-1-ylethanone) a diferentes concentraciones<sup>76</sup>. Los resultados obtenidos en este trabajo y lo reportado en la literatura, demuestran que la inhibición del proteosoma afecta la producción de viriones infectivos de dengue y que este sistema es importante para el ciclo del virus dengue.

Otro de los sistemas estudiados en esta investigación fue el citoesqueleto, para ello, las células Vero y BHK 21 con y sin infección con DENV-2 fueron tratados con diferentes concentraciones de curcumina; luego, se identificó la actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios a través de fluoróforos específicos para cada estructura y se visualizó en el microscopio de fluorescencia EVOSfl® y microscopio confocal de disco giratorio Olympus® IX-81, además se utilizaron

diferentes moléculas: Phalloidin (estabilizador de actina), Latrunculin (desorganizador de actina), Paclitaxel (estabilizador de microtúbulos), Nocodazole (desorganizador de microtúbulos) con el fin de poder comparar el efecto de estas moléculas sobre el citoesqueleto, frente al efecto producido por el tratamiento con curcumina; se determinó que existe un efecto sobre el citoesqueleto de la célula (actina, microtúbulos y filamentos intermedios) de manera dosis dependiente cuando se realiza el tratamiento con diferentes concentraciones de curcumina. También, se evidencio que a concentraciones mayores de 15  $\mu\text{M}$  la célula pierde su morfología normal y se generan células redondeadas (anexo 1), además, se observó pérdida de citoplasma celular, pérdida de las fibras de tensión de actina (Figura 13a, hasta la f) y cambio en la morfología nuclear (figura 13eI, II). De igual manera, se hizo evidente un mayor efecto del tratamiento con curcumina sobre el citoesqueleto de la célula cuando estas se encuentran infectadas con DENV-2 (figura 13eI). Cuando se realiza la comparación del efecto del tratamiento con las moléculas que estabilizan y desorganizan la actina y los microtúbulos frente al tratamiento con curcumina, se observó, un efecto similar en la células tratadas con Lantrunculin (figura 13g, 13h), esta molécula, al desorganizar la actina no permite la formación de las fibras de tensión generando un redondeamiento celular similar al observado en el tratamiento con curcumina (figura 13a al d, 13h), los tratamientos realizados con el estabilizador de microtúbulos (Paclitaxel) y estabilizador de actin (Phalloidin), no produjeron cambios en la morfología celular y no se observó daño aparente de microtúbulos, actina o filamentos intermedios (figura 13g); el desestabilizador de microtúbulos (Nocodazole) produjo algunas células redondeadas pero en general la célula se agrandaba más de lo normal, además la actina y filamentos intermedios se observaban normales (figura 13g), por lo tanto, podemos afirmar que el citoesqueleto de actina es en gran medida el responsable de la estabilidad morfológica de la célula en el modelo celular utilizado, ya que el tratamiento con Latrunculin produjo redondeamiento celular y los otros tratamientos no. Después de determinar qué efecto tenían los tratamientos con Latrunculin, Paclitaxel, Nocodazole y Phalloidin sobre la morfología celular, se evaluó el efecto de estas moléculas sobre la producción de viriones infectivos de dengue; para esto, se infectaron las células BHK-21 por 2h y posteriormente, se trató con las diferentes moléculas, después de 24 h de tratamiento, se tomó los sobrenadantes y se cuantificó la formación de placas por la técnica de recuento en placa; se evidenció, que el tratamiento con Nocodazole y Paclitaxel redujeron significativamente la producción de placas(figura 13i), mientras que los tratamientos con Lantrunculin y Phalloidin, no los disminuyeron (figura 13i), a pesar que el tratamiento con Lantrunculin produjo un cambio drástico en la morfología celular (figura 13g, 13h). Por lo tanto se puede afirmar que los microtúbulos son elementos indispensables para el ciclo del virus dengue, después de instaurarse la infección en el modelo celular utilizado en este estudio; Estas observaciones, están de acuerdo con lo reportados por Mosso et al 2008, ellos observaron una disminución en la concentración de la proteína NS1 en los sobrenadantes celulares obtenidos a partir de las células C6/36 tratadas por 1 h con Nocodazole (40  $\mu\text{M}$ ) y Cytochalasin (2,5  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>33</sup>; por su parte, Shrivastava

et al 2011, demostraron que 8 h después de la infección con DENV-2 en células BHK-21, existe una co-localización, entre los microtúbulos y la proteína de envoltura del DENV-2, ellos, concluyeron que los microtúbulos son necesarios para el transporte de la nueva proteína E que se forma en el retículo endoplasmático<sup>34</sup>, por el contrario, Chen W, et al 2008, reportaron que el tratamiento con Nocodazole (20  $\mu$ M) y Paclitaxel (1  $\mu$ M) en células ECV 304 y HepG2, aumentaban la formación de placas frente al control de infección y que el tratamiento con acrilamida a 4 mM (desorganizador de filamentos intermedios) disminuía la formación de placas del DENV-2, en la fracción celular (lisado de la célula) pero no en el sobrenadante del cultivo; Por lo tanto ellos concluyen que los microtúbulos pueden no ser importantes en el modelo de infección con DENV-2, pero que los filamentos intermedios sí<sup>77</sup>.

De acuerdo con lo expuesto hasta ahora referente a los microtúbulos, parece ser que estos son necesarios para el ciclo del virus dengue ya que permiten el transporte de proteínas virales (Shrivastava et al 2011) y que su alteración puede o no modificar la producción de placas de acuerdo con el modelo celular utilizado (Chen et al 2008, Moscoso et al 2008).

Respecto a la pregunta: ¿por qué los tratamientos con Phalloidin y Latrunculin no disminuyeron la producción de placas de DENV-2?, se han reportado diferentes estudios en los cuales se informa que actina puede ser necesario para la entrada viral a la célula y otros reporta que no, por ejemplo: Acosta et al 2008, demostraron en células C6/36, que la despolimerización de la actina inhibía la entrada del virus dengue a la célula (menor porcentaje de células infectadas) cuando se realizaban tratamientos previos a la infección con Cytochalasin D, pero si estos tratamientos se realizaban posterior a la infección, no se observaba diferencia frente al control de infección<sup>32</sup>. En el 2009 este mismo grupo realizó experimentos en células Vero y reportaron que en este modelo celular la disrupción o estabilización de los filamentos de actina no presentaban ningún efecto en la penetración del DENV-2, por el contrario, tratamientos con Nocodazole y Colchicine (despolimerizadores de microtúbulos) inhibieron la penetración del DENV-2, por lo tanto ellos concluyeron que existen diferentes tipos de penetración viral de acuerdo al tipo de célula que se estudia<sup>78</sup>. En el 2010 Wang JL et al, reportaron que el DENV-2 requiere del citoesqueleto de actina para la penetración del virus a la células ECV304, ellos demostraron que al realizar tratamientos previos a diferentes tiempos y concentraciones con Jasplakinolide (estabilizador de actina y Cytocalasina D (depolimerizador de actina), se inhibe la entrada viral a la célula, en este estudio ellos concluyeron que en este modelo celular es necesario el citoesqueleto de actina para la penetración viral<sup>79</sup>; por otra parte, estudios anteriores en modelo de cáncer han demostrado que la curcumina tiene la capacidad de unirse a la tubulina<sup>36,38</sup> y a la F actina<sup>37</sup>; Por lo tanto existe evidencia de que la curcumina se une a algunos componentes del citoesqueleto y puede alterar su función. Todo lo anterior permite afirmar, que el papel que juega el citoesqueleto de actina en la penetración e instauración de la infección viral depende del modelo celular utilizado, además demuestra la gran versatilidad del virus dengue para penetrar y producir una infección viral. Los resultados obtenidos

en esta investigación demostraron que el tratamiento con curcumina afecta el citoesqueleto de actina ya que altera la formación de las fibras tensión y la morfología celular, este efecto se presenta con mayor severidad en la célula infectada con DENV-2 y tratada con curcumina. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, la estabilización y la depolimerización de la actina no afectarían la producción de viriones infectivos de dengue después de instaurada la infección, aunque la estabilización y despolimerización de microtúbulos sí. Por otra parte, los tratamientos con curcumina produce un alteración sobre el citoesqueleto de actina, microtúbulos y filamentos intermedios los cuales afectan el ciclo del virus dengue, ya que como se demostró una retención de la proteína viral a nivel perinuclear y en el citoplasma celular (figura 10eI, II y 10f).

La activación de apoptosis por parte de la curcumina ha sido estudiada ampliamente en el modelo de cáncer<sup>42-44</sup>, Se ha reportado que la curcumina tiene la capacidad de inducir apoptosis a través de diferentes mecanismos como: agregación de Fas ligando, activación de receptores de muerte celular, activación de caspasas, activación mitocondrial, producción de estrés del retículo endoplasmático, entre otros<sup>45,46</sup>; Esta investigación, pudo demostrar en un modelo viral que la curcumina induce apoptosis dosis dependiente de la concentración utilizada (figura 16a y 16b), además, se evidenció que las células infectada con DENV-2 y tratada con diferentes concentraciones de curcumina presentan un porcentaje mayor de apoptosis, frente a los controles sin infección tratados con la misma concentración de curcumina (figura 16a y 16b), esta observación fue corroborada, a través de la cuantificación relativa de caspasa 3 activada (C3A), donde se encontró que las células infectadas y tratadas con curcumina presentaban mayor proporción de C3A y que existía una diferencia significativa entre este grupo y su control sin infección a partir del tratamiento con curcumina de 15  $\mu\text{m}$  (figura 16c); también se corroboró que el tratamiento con curcumina altera la morfología de la mitocondria (figura 16d), lo que podría indicar una activación de apoptosis a través de esta vía. La producción de apoptosis está ligado en muchos casos a la generación de estrés del retículo endoplasmático; este orgánulo, coordina el plegamiento de las proteínas, biosíntesis de lípidos, almacenamiento de calcio entre otras funciones, la perturbación o daño de alguno de estos mecanismos, pueden generar la acumulación de proteínas alteradas o aglomeración proteínas, que a su vez generan, estrés del retículo endoplasmático; el cual desencadena una respuesta mediada principalmente 3 sensores que incluyen: la proteína IRE-1 (inositol requiring element-1), PERK (PKR-like ER kinase), ATF-6 (activating transcription factor 6). Estos 3 sensores se mantienen en una forma inactiva en condiciones normales, IRE-1 y ATF6 unido a la proteína BiP y PERK a chaperonas; la acumulación de proteínas alteradas, genera una liberación de BiP y de las chaperonas lo que produce la activación de los sensores.

PERK, genera fosforilación del factor eIF2 el cual a su vez, disminuye la síntesis de proteínas, IRE-1: genera la activación de la proteína XBP-1S, la cual induce la expresión de proteínas que ayudan a la maduración, plegamiento, transporte y degradación de proteínas. ATF-6: genera la transcripción de genes de chaperonas

(por ejemplo GRP78), incrementando la capacidad del retículo endoplasmático en el plegamiento de proteínas. Cuando la respuesta al estrés del retículo endoplasmático falla y no se restaura la capacidad del plegamiento de proteínas, se desencadena la apoptosis por la activación de la vía intrínseca o extrínseca<sup>64,65</sup>. En el modelo de cáncer, sea demostrado que el tratamiento con curcumina induce estrés del retículo endoplasmático debido a que activa la respuesta al estrés, a través del aumento en la expresión de pPERK, p-eIF2 $\alpha$ , GRP78/Bip<sup>40</sup>. el caso contrario, fue evidenciado en esta investigación, donde se comprobó que el tratamiento con curcumina disminuye de manera dosis dependiente la proporción de estas moléculas en las células tratadas frente al control, este mismo efecto se observó en las células infectadas y tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, pero existe diferencia significativa entre el control de infección y el control de células sin infección (figura 15), lo cual demuestra que la infección con DENV-2 aumenta la expresión de la proteínas de respuesta al estrés del retículo endoplasmático; esto está de acuerdo con algunos estudios donde se observó que la infección por el virus dengue produce estrés del retículo endoplasmático e induce apoptosis en la célula infectada<sup>80-83</sup>.

Los resultados obtenidos en este trabajo y la revisión bibliográfica, permiten generar la siguiente hipótesis:

Cuando se realiza tratamientos con curcumina en las células Vero o BHK 21, esta molécula afecta de manera dosis dependiente, la fluidez de la membrana celular y se acumula a nivel del retículo endoplasmático, altera la función del citoesqueleto de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, altera la función del proteosoma, acumulando las proteínas para degradación a nivel del citoplasma celular, disminuye la respuesta al estrés del retículo endoplasmático, todos estos efectos activan la caspasa 3 y la apoptosis y generan muerte celular. Pero cuando la célula se encuentra infectada, además, de la alteración que produce la curcumina, la infección con DENV-2, aumenta el estrés celular y esto desencadena una activación de apoptosis más temprana, que en la célula sin infección. Por otra parte, el hecho que la célula no muera por apoptosis, no significa que la curcumina no esté afectando los diferentes sistemas celulares, aunque el efecto pueda ser menor, esto explicaría por qué en los tratamientos con concentraciones bajas de curcumina (10  $\mu$ M y 15  $\mu$ M) se observa una disminución en la formación de PFUs; además, la recuperación en la capacidad reproductiva de la célula y el aumento de los recuentos de PFUs después de eliminar la curcumina de las células infectadas, nos demuestra que el efecto de la curcumina sobre los diferentes sistemas celulares es reversible y depende de la dosis.

## **VIII. Conclusiones.**

1. El tratamiento con curcumina presenta dosis no tóxicas a las 24 h. hasta 30  $\mu\text{M}$ ; a las 24 y 48 h las concentraciones no tóxicas se encuentran por debajo de 30  $\mu\text{M}$ .
2. El tratamiento con curcumina a diferentes concentraciones afecta la producción de viriones infectivos de dengue.
3. El tratamiento con curcumina a diferentes concentraciones afecta el citoesqueleto de actina, microtúbulos, filamentos intermedios y el sistema ubiquitina-proteosoma.
4. El tratamiento con curcumina induce apoptosis de manera dosis dependiente de la concentración utilizada.
5. La curcumina se acumula en la membrana celular y al retículo endoplasmático.
6. La curcumina disminuye la proporción de proteínas relacionadas con respuesta al estrés del retículo endoplasmático (IRE, PERK, pPERK y ATF-6).
7. El efecto de la curcumina sobre la morfología celular es dosis dependiente y es reversible a la eliminación del tratamiento.
8. En las células infectadas con DENV-2 y tratadas con diferentes concentraciones de curcumina se observa un mayor efecto a nivel de la alteración del citoesqueleto de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, marcaje con anexina V, alteración del sistema ubiquitina-proteosoma.

## Bibliografía.

1. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:787-80.
2. Araújo CA, Leon LL. Biological Activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:723-28.
3. Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol.* 2007;27:19-35.
4. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007;595:1-75.
5. Saleheen D, Ali SA, Ashfaq K, Siddiqui AA, Agha A, Yasinzai MM. Latent activity of curcumin against leishmaniasis in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:386-9.
6. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39:283-99.
7. Bharat B. A and bokyung S. pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: and age-old spice with modern targets. *Trend in pharmacological sciences.* 2008;30:85–94.
8. Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *Biofactors.* 2013;39:2-13.
9. Pommier Y, Johnson AA, Marchand C., integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature reviews.* 2005;4:236-48.
10. Seal A, Aykhal R, Babu RO, Ghosh M. Docking study of HIV-1 reverse transcriptase with phytochemicals. *Bioinformation.* 2011;5:430-9.
11. Kim HJ, Yoo HS, Kim JC, Park CS, Choi MS, Kim M, et al. Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication. *J Ethnopharmacol.* 2009;124:189-96.
12. Rechtman MM, Har-Noy O, Bar-Yishay I, Fishman S, Adamovich Y, Shaul Y, Halpern Z, Shlomai A. Curcumin inhibits hepatitis B virus via down-regulation of the metabolic coactivator PGC-1 $\alpha$ . *FEBS Lett.* 2010;584:2485-90.

13. Hergenrother M, Soto U, Weninger A, Polack A, Hsu CH, Cheng AL, Rösl F. The chemopreventive compound curcumin is an efficient inhibitor of Epstein-Barr virus BZLF1 transcription in Raji DR-LUC cells. *Mol Carcinog.* 2002;33:137-45.
14. Si X, Wang Y, Wong J, Zhang J, McManus BM, Luo H. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system by curcumin suppresses coxsackievirus B3 replication. *J Virol.* 2007;81:3142-50.
15. Siew T, Pippen R, Yusof R, Rahman N, Ibrahim H, Khalid N. Screening of selected zingiberaceae extracts for dengue-2 virus protease inhibitory activities. *Sunway Academic Journal.* 2006;3:1-7.
16. Dutta K, Ghosh D, Basu A. Curcumin protects neuronal cells from Japanese encephalitis virus-mediated cell death and also inhibits infective viral particle formation by dysregulation of ubiquitin-proteasome system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4:328-37.
17. Chen TY, Chen DY, Wen HW, Ou JL, Chiou SS, Chen JM, Wong ML, Hsu WL. Inhibition of enveloped viruses infectivity by curcumin. *PLoS One.* 2013;8:e62482. doi: 10.1371/journal.pone.0062482
18. Calisher CH. Persistent emergence of dengue. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:738-9.
19. Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:33-42.
20. Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 2013;3. doi:10.3402/iee.v3i0.19839
21. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11:369-77.
22. Hadinegoro SR. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatr Int Child Health.* 2012;32:33-8.
23. Chen D, Dou QP. The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Curr Protein Pept Sci.* 2010;11:459-70.
24. Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Nukina N. Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J Biol Chem.* 2004;279:11680-5.

25. Aggarwal BB. Targeting Proteasomal Pathways by Dietary Curcumin for Cancer Prevention and Treatment. *Curr Med Chem*. 2013 Jun 25. [Epub ahead of print]
26. Mullally J. E and Fitzpatrick F. A.. Pharmacophore Model for Novel Inhibitors of Ubiquitin Isopeptidases That Induce p53-Independent Cell Death. *Mol Pharmacol*. 2002;62:351- 58.
27. Milacic V, Banerjee S, Landis-Piowar KR, Sarkar FH, Majumdar AP, Dou QP. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2008;68:7283–92.
28. Döhner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, Sodeik B. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*. 2002;13:2795-809.
29. Suikkanen S, Aaltonen T, Nevalainen M, Välilehto O, Lindholm L, Vuento M, Vihinen-Ranta M Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol*. 2003;77:10270-9.
30. Wang J, Fang S, Xiao H, Chen B, Tam JP, Liu DX. Interaction of the coronavirus infectious bronchitis virus membrane protein with beta-actin and its implication in virion assembly and budding. *PLoS One*. 2009;4:e4908. doi: 10.1371/journal.pone.0004908
31. Chee HY, AbuBakar S Identification of a 48kDa tubulin or tubulin-like C6/36 mosquito cells protein that binds dengue virus 2 using mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320:11-7.
32. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol*. 2008;89:474-84.
33. Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology*. 2008;378:193-9.
34. Shrivastava N, Sripada S, Kaur J, Shah PS, Cecilia D. Insights into the internalization and retrograde trafficking of Dengue 2 virus in BHK-21 cells. *PLoS One* 2011;6:e25229. doi: 10.1371/journal.pone.0025229.
35. Holy J. Curcumin inhibits cell motility and alters microfilament organization and function in prostate cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2004;58:253-68.

36. Gupta KK, Bharné SS, Rathinasamy K, Naik NR, Panda D. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. *FEBS J.* 2006;273:5320-32.
37. Chen Q et al. Cytoskeleton Disorganization during Apoptosis Induced by Curcumin in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Planta Med.* 2009;75:808-13.
38. Chakraborti S, Das L, Kapoor N, Das A, Dwivedi V, Poddar A, et al, Curcumin recognizes a unique binding site of tubulin. *J Med Chem.* 2011;54:6183-96.
39. S. Salvioli, E. Sikora, E. L. Cooper and C. Franceschi. Curcumin in Cell Death Processes: A Challenge for CAM of Age-Related Pathologies. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2007;4:181-90.
40. Pae HO, Jeong SO, Jeong GS, Kim KM, Kim HS, Kim SA, Kim YC, Kang SD, Kim BN, Chung HT Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;23;353:1040-5.
41. Bakhshi j et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin. *Apoptosis.* 2008; 13:904-14.
42. Li Y, Zhang S, Geng JX, Hu XY. Curcumin Inhibits Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cell Proliferation Through Regulation of Bcl-2/Bax and Cytochrome C. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:4599-4602.
43. Wu SH, Hang LW, Yang JS, Chen HY, Lin HY, Chiang JH et al. Curcumin induces apoptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through ER stress and caspase cascade- and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res.* 2010;30:2125-33.
44. Cao A, Li Q, Yin P, Dong Y, Shi H, Wang L, et al. Curcumin induces apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells and colon carcinoma HT-29 cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis.* 2013;18:1391-402. doi: 10.1007/s10495-013-0871-1.
45. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *AAPS J.* 2009;11:495-510.
46. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2008;76:1340-51.

47. Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40:91-101.
48. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:71-92.
49. Guzman A, Istúriz RE Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:S40-2.
50. Ross TM Dengue virus. *Clin Lab Med*. 2010;30:149-60
51. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370:1644-52.
52. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013;158:1445-59.
53. Martínez. E. Dengue. *Estudios Avanzados*. 2008;22:33-52.
54. Halstead SB. Dengue: the syndromic basis to pathogenesis research. Inutility of the 2009 WHO case definition. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88:212-5.
55. Flint S J, Enquist L W, Racaniello V R, Skalka A M. Principles of virology. ASM press. Third Edition. Washington D.C. 2009.
56. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. 2013;98:192-208.
57. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J*. 2005;24:3353-9.
58. Acconcia F, Sigismund S, Polo S. Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res*. 2009;315:1610-8.
59. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002;82:373-428.
60. Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res*. 2007;100:1276-91.

61. Cooper y Hausman. La célula . cuarta edición, editorial Marbán. 2008. Pag: 473- 528.España.
62. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.
63. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, Los MJ. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61:43-58.
64. Naidoo N. ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev.* 2009;8:150-9.
65. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.028.
66. World Health Organization (2009) Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. OMS/TDR. Accessed 22 July 2011 [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf).
67. Balmaseda a. et al. Manual de procedimientos de técnicas para el diagnóstico del dengue. Organización panamericana de la salud /Organización mundial de la salud. 2002.
68. Gallego-Gomez JC, Risco C, Rodríguez D, Cabezas P, Guerra S, Carrascosa JL, Esteban M. Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J Virol.* 2003;77:10606–22.
69. Ulukaya E, Ozdikicioglu F, Oral AY, Demirci M. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol In Vitro.* 2008;22:232-9.
70. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Lídice B, Morier L, Guzman-G M. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *dengue bulletin.* 2005;29:49-57.
71. Jeffrey Barry, Michelle Fritz, Jeffrey R. Brender, Pieter E.S. Smith, Dong-Kuk Lee, and Ayyalusamy Ramamoorthy Determining the Effects of Lipophilic Drugs on Membrane Structure by Solid-State NMR Spectroscopy– The Case of the Antioxidant Curcumin *J Am Chem Soc.* 2009;131:4490–98.

72. Sun Y, Lee CC, Hung WC, Chen FY, Lee MT, Huang HW. The bound states of amphipathic drugs in lipid bilayers: study of curcumin. *Biophys J.* 2008; 95: 2318-24.) (Hung WC, Chen FY, Lee CC, Sun Y, Lee MT, Huang HW. Membrane-thinning effect of curcumin. *Biophys J.* 2008;94:4331-8.
73. Chen G, Chen Y, Yang N, Zhu X, Sun L, Li G, interaction between curcumin and mimetic biomembrane. *Sci China Life Sci.* 2012;55:527-32.
74. Fink J, Gu F, Ling L, Tolfvenstam T, Olfat F, Chin KC, et al. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1:e86.
75. Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. The ubiquitin-proteasome pathway is important for dengue virus infection in primary human endothelial cells. *J Proteome Res.* 2010;9:4960-71.
76. Nag DK, Finley D. A small-molecule inhibitor of deubiquitinating enzyme USP14 inhibits Dengue virus replication. *Virus Res.* 2012;165:103-6.
77. Chen W, Gao N, Wang JL, Tian YP, Chen ZT, An J. Vimentin is required for dengue virus serotype 2 infection but microtubules are not necessary for this process. *Arch Virol.* 2008;153:1777-81.
78. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol.* 2009;11:1533-49.
79. Wang JL, Zhang JL, Chen W, Xu XF, Gao N, Fan DY, An J. Roles of small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e809. doi: 10.1371/journal.pntd.0000809.
80. Thepparit C, Khakpoor A, Khongwichit S, Wikan N, Fongsaran C, Chingsuwanrote P, Panraksa P, Smith DR. Dengue 2 infection of HepG2 liver cells results in endoplasmic reticulum stress and induction of multiple pathways of cell death. *BMC Res Notes.* 2013;14;6:372-7.
81. Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, Gu F. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Viol J.* 2007;4:91-7.
82. Peña J, Harris E. Dengue virus modulates the unfolded protein response in a time-dependent manner. *J Biol Chem.* 2011;286:14226-36.

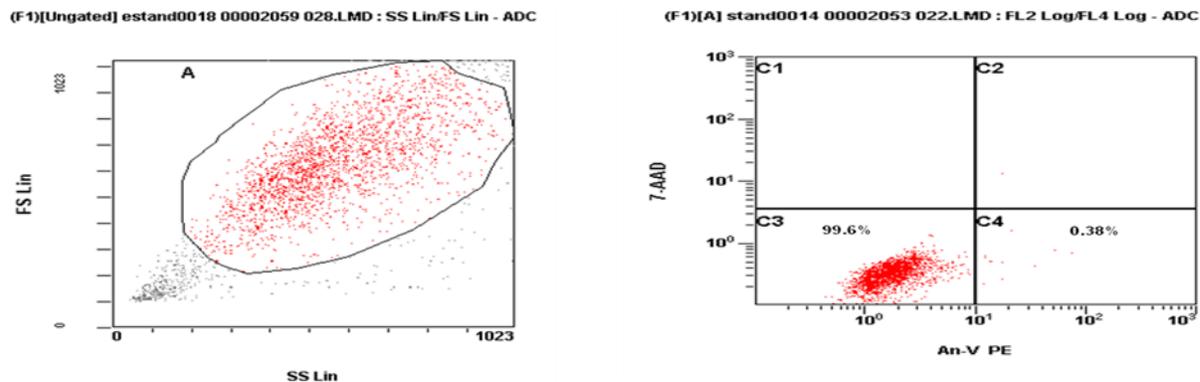
## Anexo 1.

Estandarización de la citometría de flujo para realizar la medición de apoptosis.

antes de realizar la medición de apoptosis por citometría de flujo, se realizó la estandarización de las ventanas donde se debería medir las células que presentaban, apoptosis temprana (marcaje solo de anexina V), necrosis (marcaje solo de 7AAD), apoptosis y daño de la membrana celular (marcaje de anexina V y 7AAD) y células infectadas y sin infectar; para esto se desprendieron las células BHK-21 y se determinó cual era el tamaño y la granularidad de las células para poder ubicarlas adecuadamente y que correspondieran a una viabilidad superior al 99%, posteriormente se realizaron lecturas de controles de células sin tratamiento ni infección, células en apoptosis y células en necrosis, de tal manera que se pudiera ubicar cada una de las poblaciones respectivas, después de ajustar estas poblaciones en el lugar que correspondía se realizó la citometría de las células tratadas a diferentes concentraciones con curcumina (10 a 30  $\mu$ M de curcumina) en infectadas y sin infectar.

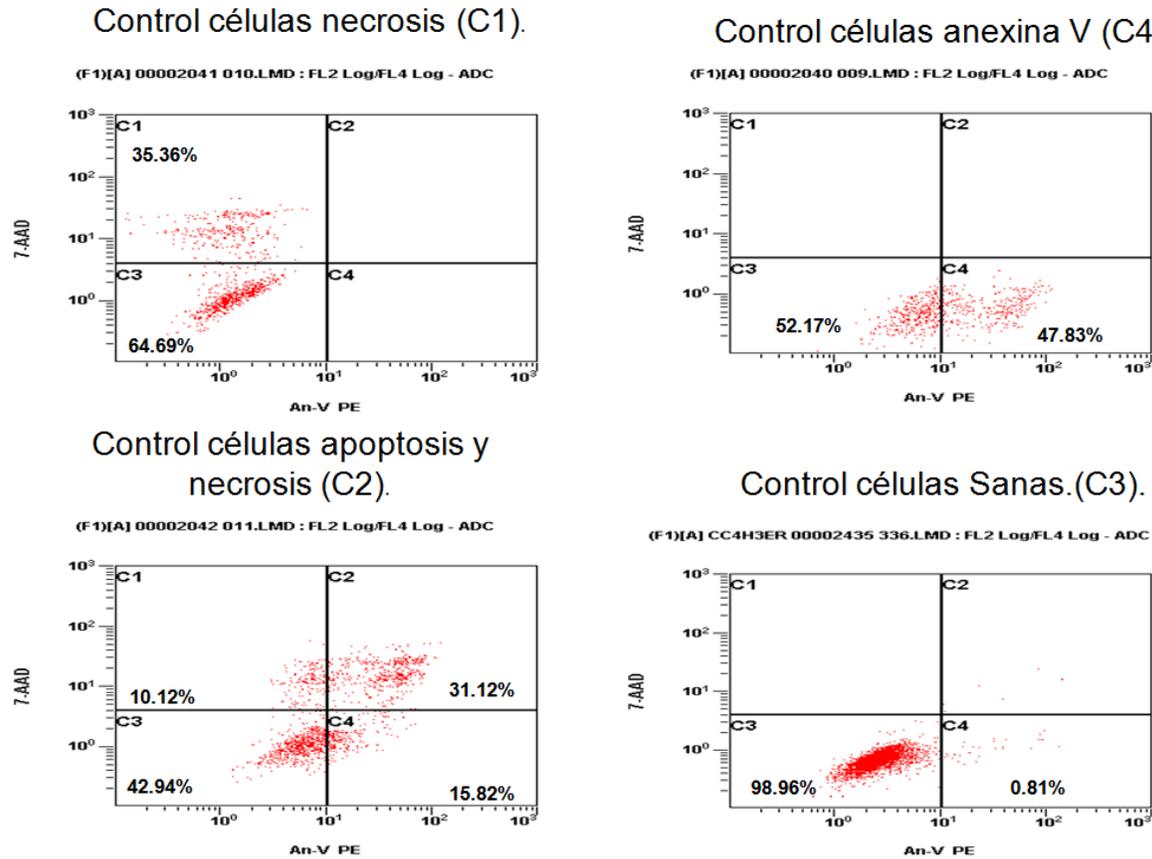
Figura 1. Estandarización de la posición y granularidad de las células BHK-21

a. Posición y granularidad de las células BHK-21. b. determinación de la posición de las células BHK-21 viables



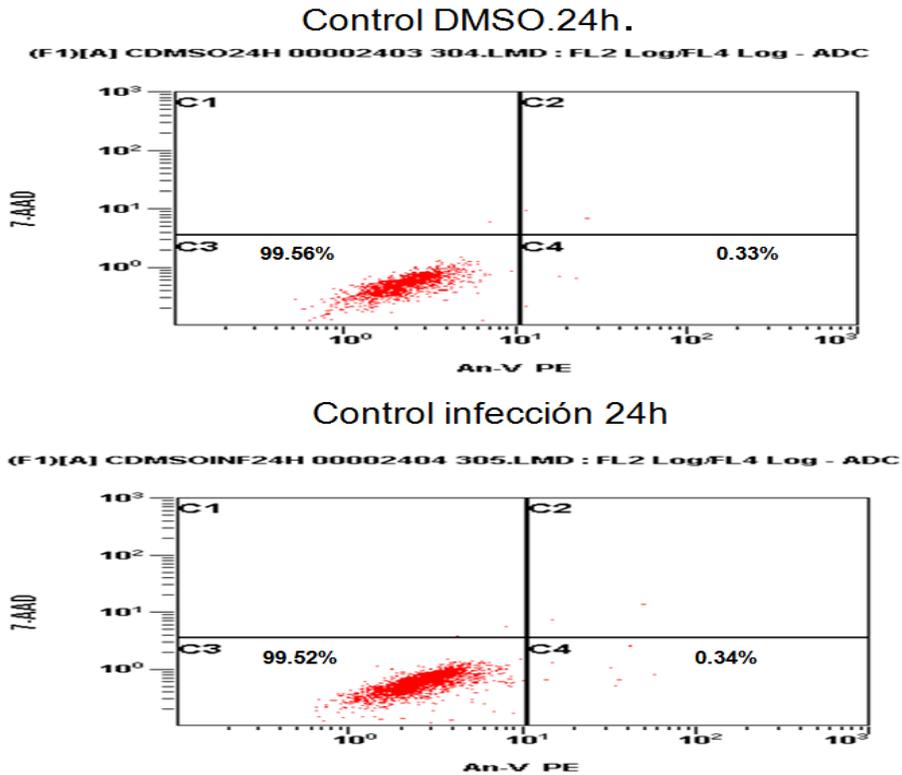
Como se evidencia en la figura 1a y b, las células BHK-21 poseen un tamaño y granularidad variable, por lo cual fue necesario realizar un Gate, amplio que incluía la mayoría de las células, además, este Gate, correspondía exclusivamente a células que estaban viables. (Cuadrante C3 figura 1b).

Figura 2. Verificación de la clasificación de los diferentes tipos de células que se pueden medir por citometría flujo, utilizando el kit Aposcreen annexin V.



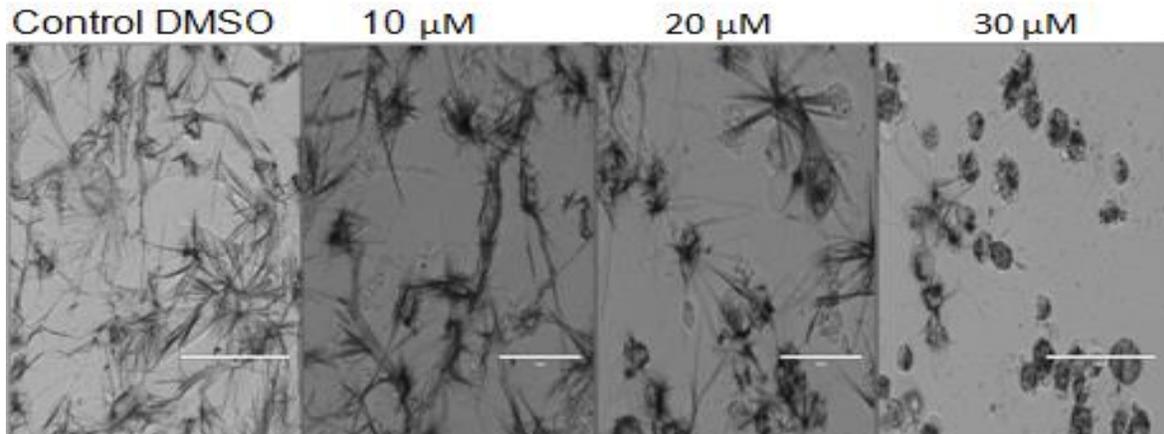
Como se observa en la figura 2, los controles utilizados para evidenciar la clasificación de las células en diferentes procesos fueron realizados de forma adecuada; en el control de apoptosis y necrosis, se pueden evidenciar los 4 tipos poblaciones celulares que se pueden encontrar en los diferentes experimentos. Estos controles nos evidenciaron que el citómetro tenía la capacidad de clasificar las células adecuadamente.

Figura 3. Medición del porcentaje de células marcadas con anexina V, en el control de células infectadas y no infectadas.



Como se observa en la figura 3, los porcentajes de viabilidad de las células infectadas y las células no infectadas tratadas con DMSO (diluyente de la curcumina al 0,24%), no presentan diferencia en el marcaje con anexina V, lo cual nos indica que la infección con DENV-2 en las primeras 24h no incrementa la producción de apoptosis y que el DMSO no es responsable del incremento de apoptosis en las células.

Anexo 2. Formación de cristales de formazan en células tratadas con diferentes concentraciones de curcumina por 24 h.

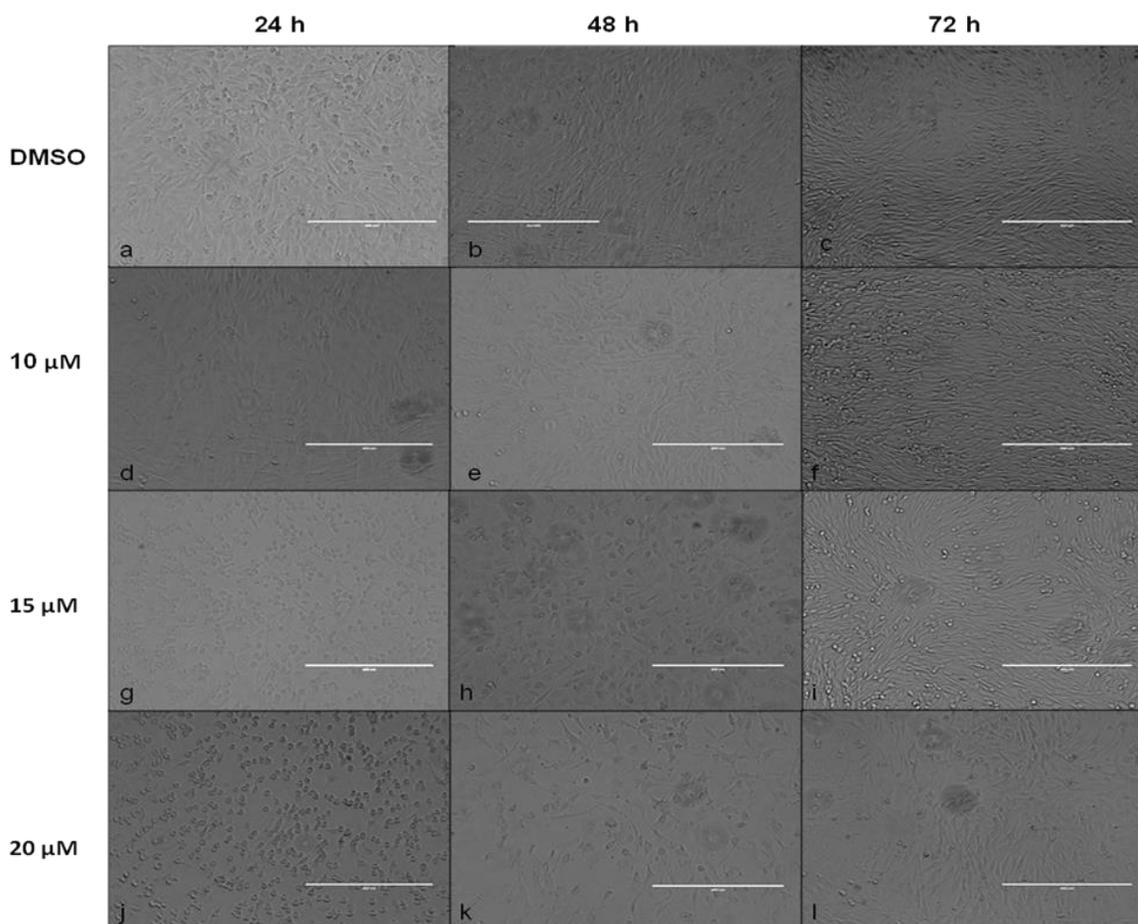


Control DMSO; Células tratadas con 0,24% DMSO; 10 μM. 20 μM, 30 μM tratamientos con diferentes concentraciones de curcumina.

En el anexo 2, se hace evidente la formación de cristales de formazan por parte de las células que fueron tratadas con diferentes concentraciones de curcumina, lo cual significa, que la deshidrogenasa láctica mitocondrial sigue activa, a pesar que muchas de las células han cambiado su morfología, especialmente en los tratamientos de 20 μM y 30 μM.

### Anexo 3.

Observación por 96 h, del crecimiento celular después del tratamiento con curcumina por 24 h,



DMSO, células control crecidas con 0,24% de DMSO, 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  tratamientos con curcumina; a, d, g, j, fotos tomadas después de 24 h de tratamiento con curcumina; b, e, h, k, fotos tomadas 24 h después de retirado el tratamiento con curcumina (48 h); c, f, i, l, fotos tomadas 48 h después de retirado el tratamiento con curcumina (72 h).

En el anexo 3, se observa un cambio morfológico (redondeamiento) de las células Vero, dosis dependiente de la concentración de curcumina utilizada cuando se realiza el tratamiento por 24 h (panel g y j); a las 48 horas se observa que las células recuperan su morfología normal, este cambio es más evidente en la concentración de 15  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  (panel h y k). A las 72 h se hace evidente un mayor número de células, lo cual indica que recuperaron su capacidad de reproducción (panel c, f, i y l.)