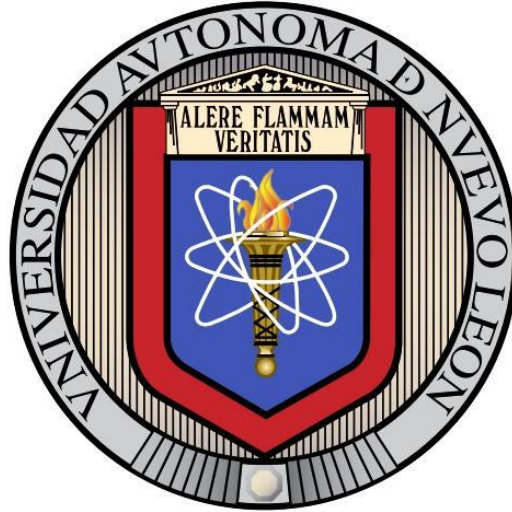


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFEECTO DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FOXC1 Y SNAI1**

POR

M.C.P. ANGEL GABRIEL ESTRADA CÁRDENAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

MARZO, 2019

**El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Infectología
Molecular del departamento de Bioquímica y Medicina
Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad
Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Ana María
Rivas Estilla.**



**EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C
EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FOXC1 Y SNAI1**

Aprobación de Tesis:

Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla
Directora de Tesis

Dr. C. Alberto Camacho Morales
Co-Director de Tesis

Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez
Miembro de la Comisión de Tesis

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y en especial a mi madre, por su apoyo en momentos críticos y su amor incondicional.

A la Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla, directora de tesis, por aceptarme como estudiante en su laboratorio, su orientación en el transcurso del proyecto, las oportunidades que me brindó y los conocimientos transmitidos.

Al Dr. C. Alberto Camacho Morales, co-director de tesis por aceptar ser parte de la revisión de este texto y por las críticas constructivas hacia este trabajo. Gracias también por ayudarme a conseguir los reactivos que se utilizaron para el desarrollo de los objetivos de este trabajo.

Al Dr. C. Román Vidal Tamayo Ramírez, miembro de la comisión de tesis, por su asesoría en el diseño de plásmidos.

A la Dra. C. Sonia Lozano Sepúlveda por su orientación, apoyo y paciencia, indispensables para la realización de este proyecto.

A la M.C. Tanya Salas Villalobos por compartir su experiencia.

Al Dr. C. Kame Galán Huerta y a la M.C. Magda Vera García por toda su ayuda y su buena disposición.

A todo el equipo infecto: Dr. Daniel Arellanos Soto, M.C. Diana Rodríguez, M.C. Mayra Meléndez y M.C. Verónica Alvarado; por todos sus consejos y apoyo durante la realización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros de generación: Orlando Daniel Solís Coronado, José Luis Nava Ríos y Juan Ángel García Quiñones, por estar siempre presentes.

A mis profesores y compañeros del Departamento de Bioquímica.

A todo personal administrativo del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: Juany Hinojos Escobedo, Lic. Ariadna López Gutiérrez, C.P. Ruth Cervantes Juárez, Cristy Jiménez, Lic. Mario Sánchez y al Sr. Eduardo Cisneros, por toda la ayuda proporcionada en estos dos años de entrenamiento.

A las autoridades de la Coordinación de Área Básica de la Subdirección de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL, por las facilidades que me dieron para realizar el programa de Maestría en Ciencias y por el apoyo económico para presentar resultados de mi tesis en congresos nacionales e internacionales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme ser un becario



ÍNDICE

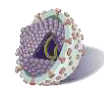
ABREVIATURAS, FORMULAS Y SIMBOLOS	V
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN	XI
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Epidemiología.....	1
1.1.1 Vías de transmisión	3
1.1.2 Epidemiología en México	3
1.2 Historia natural de la enfermedad	4
1.2.1 Cuadro clínico.....	5
1.3 El Virus de la hepatitis C.....	7
1.3.1 Función de las proteínas virales.....	7
1.3.2 Ciclo viral	8
1.4 Tratamiento.....	9
1.4.1 Antivirales de acción directa	10
1.4.1.1 Los AAD y el CHC	12
1.4.2 Agentes huésped-blanco.....	12
1.5 Patogénesis	14
1.5.2 El VHC y la fibrosis hepática	14
1.5.2.1 TEM en la fibrogénesis Hepática	14
1.5.3 El VHC y el cáncer.....	17
1.8 El VHC y la TEM	18
1.6 FOXC1	18
1.6.1 Regulación de FOXC1	19
1.7 Snai1.....	22
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES.....	23
CAPÍTULO 3: JUSTIFICACION	26
CAPÍTULO 4: OBJETIVOS.....	27
CAPÍTULO 5: MATERIALES.....	28
5.1 Reactivos	28



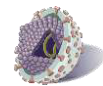
5.1.1 Reactivos de uso general.....	28
5.1.2 Cultivo celular.....	28
5.1.3 Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR).....	28
5.1.4 Extracción de proteínas y Western Blot.....	29
5.1.5 Materiales biológicos	29
5.2 Equipos	29
CAPÍTULO 6: METODOS.....	31
6.1 Estrategia general.....	31
6.2 Métodos	32
6.2.1 Diseño del plásmido de Core.....	32
6.2.2 Preparación y transformación de células <i>E. coli</i> TOP 10 Calciocompetentes	32
6.2.2.1 Preparación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl ₂ 32	
6.2.2.2 Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl ₂ (Cohen, Chang, & Hsu, 1972)	33
6.2.3 Preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS: Midiprep.....	34
6.2.4 Lisis celular	35
6.2.5 Recuperación del plásmido	36
6.2.5.1 Caracterización de plásmido Core.....	37
6.2.5.2 Caracterización del plásmido pFK1, NS5A y Core.....	37
6.2.5.3 Purificación del ADN plasmídico a partir de gel de agarosa al 1%.....	37
6.2.6 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante	37
6.2.7 Cultivo de células Hela	37
6.2.8 Ensayo de actividad biológica de virus vaccinia.....	38
6.2.9 Cultivo de células HuH-7	38
6.2.9.1 Stock de células HuH-7 Parental	38
6.2.9.2 Subcultivo de células HuH-7 Parental	38
6.2.10 Cultivo de células HuH7 Replicón.....	39
6.2.10.1 Subcultivo de células HuH7 Replicón	40
6.2.11 Ensayo de transfección transitoria.....	40
6.2.12 Extracción de ARN total a partir de células en monocapa por el método de TRIzol® .	41
6.2.13 Retrotranscripción mediante M-MLV (RT-PCR M-MLV)	43
6.2.14 Cuantificación relativa del ARN viral por RT-PCR en Tiempo Real.....	44
6.2.14.1 Genes pFK1 (proteínas no estructurales) y NS5A	44
6.2.14.2 Gen de la proteína Core del VHC.....	45



6.2.14.3 Gen endógeno RPS18	46
6.2.14.4 Gen FOXC1.....	47
6.2.14.5 Gen SNAI1.....	48
6.2.15 Extracción y cuantificación de proteínas totales	48
6.2.15.1 Extracción de proteínas totales.....	48
6.2.15.2 Cuantificación de proteínas por Método de Bradford.....	49
6.2.16 SDS-PAGE y electrotransferencia en condiciones húmedas	49
6.2.16.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	49
6.2.16.2 Electrotransferencia en condiciones húmedas.....	49
6.2.17 Ensayo de Western blot	50
CAPÍTULO 7: RESULTADOS	52
7.1 Diseño del plásmido de Core.....	52
7.2 Midiprep.....	54
7.3 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante	56
7.4 Comparación de la expresión de las líneas celulares Huh7 y Huh7-VHC Replicón	57
7.5 Ensayo de actividad biológica de virus vaccinia.....	60
7.6 Transfección transitoria de células HuH-7 con pFK1.....	61
7.6.1 Expresión a nivel transcripcional de los genes de las proteínas no estructurales del VHC.....	61
7.6.2 Expresión a nivel transcripcional de los genes FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con pFK1.....	63
7.7 Transfección transitoria de células HuH-7 con NS5A.....	65
7.7.1 Expresión a nivel transcripcional de NS5A.....	65
7.7.2 Expresión a nivel transcripcional de los genes FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con NS5A.....	67
7.8 Transfección transitoria de células HuH-7 con Core.....	68
7.8.1 Expresión a nivel transcripcional de Core.....	68
7.8.2 Expresión a nivel transcripcional de los genes FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con Core.....	70
7.9 Transfección transitoria de células HuH-7 con los plásmidos pcDNA, Core, NS5A y pFK1, estudio de la expresión a nivel traduccional.....	71
7.9.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	71
7.9.2 Western Blot.....	72
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN	74

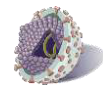


CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES	78
REFERENCIAS.....	79
CAPITULO 9: ANEXOS	84
9.1 Cultivo celular.....	84
9.1.1 Suplementación de medio de cultivo.....	84
9.1.2 MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.....	85
9.1.3 RECUENTO CELULAR.....	86
9.1.4 CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	88
9.1.5 DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES.....	89
9.2 Virus Vaccinia	89
9.2.1 Preparación de virus vaccinia.....	89
9.2.2 Evaluación del efecto citopático del virus vaccinia	91
9.3 Proteínas	92
9.3.1 Extracción de proteínas.....	92
9.3.2 Curva estándar de referencia de proteínas.....	93
9.3.3 SDS-PAGE.....	94
9.3.4 Transferencia a la membrana de PVDF.	95
9.3.5 Western Blot	95
9.3.6 Quimioluminiscencia.....	96
9.4 Preparación de Reactivos.....	96
9.4.1 Genética	96
9.4.2 Electroforesis.....	96
9.4.3 Western blot.....	99



ABREVIATURAS, FORMULAS Y SIMBOLOS

ADN Ácido Desoxirribonucleico
ARN Ácido Ribonucleico
ARNm Ácido Ribonucleico mensajero
°C Grados centígrados
cADN Ácido desoxirribonucleico complementario
CaCl₂ Cloruro de Calcio
CHC Carcinoma hepatocelular
EDTA Ácido etilen-diamino-tetraacético.
Da Daltones
DEPC Dietilpirocarbonato
dNTPs Desoxirribonucleótido trifosfatados
FOXC1 Factor de transcripción de la familia forkheadbox
GAPDH Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
g Gramos
h Horas
HCC Hepatitis C crónica
Kb Kilobases
KDa Kilodaltones
LB Luria Bertani
MgCl₂ Cloruro de Magnesio
M Molar
μM Micromolaridad
μg Microgramos
μL Microlitros
ng Nanogramos
nM Nanomolaridad
NS5A Proteína no estructural 5A del VHC
OMS Organización Mundial de la Salud
pb Pares de bases
PBS Solución Buffer de Fosfatos
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
pFK1 plásmido que codifica para las proteínas no estructurales del VHC
pNS5A plásmido que codifica para NS5A
pH Potencial de hidrógeno
qPCR PCR cuantitativa
rpm Revoluciones por minuto
RT-MMLV Retrotranscriptasa del virus de la leucemia Murina
s segundos
SNAI1 Factor de transcripción de la familia SNAIL
TE Buffer Tris-EDTA
UV Ultravioleta
V Volts
VHC Virus de la Hepatitis C
Wb Western blot
SDS Dodecil sulfato de sodio



LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Principales causas de cirrosis hepática y cáncer de hígado en el mundo, entre los años 1998 y 2013.	3
Tabla 2: Opciones terapéuticas para el VHC genotipo 1 disponibles en el mundo en el 2014-2015.	10
Tabla 3: Mezcla 1 para retrotranscripción de ARN con RT-MMLV.	43
Tabla 4: Mezcla 2 para retrotranscripción de ARN con RT-MMLV.	44
Tabla 5: Condiciones de retrotranscripción de ARN con RT-MMLV.	44
Tabla 6: Reactivos para qPCR (Células transfectadas con pFK1).	45
Tabla 7: Reactivos para qPCR (Células transfectadas con NS5A).	45
Tabla 8: Condiciones generales de amplificación para qPCR.	45
Tabla 9: Reactivos para qPCR (gen de la proteína Core del VHC).	46
Tabla 10: Reactivos para qPCR (gen endógeno RPS18).	46
Tabla 11: Reactivos para qPCR (gen FOXC1).	47
Tabla 12: Reactivos para qPCR (gen SNAI1).	48
Tabla 13: Concentración del plásmido extraído.	55
Tabla 14: Oligonucleótidos diseñados que se usaron durante este proyecto.	56
Tabla 15: Concentración de ARN extraído de las células transfectadas con pFK1 y el control con pcDNA.	62
Tabla 16: Concentración de cDNA retrotranscrito a partir de ARN extraído de células transfectadas con pFK1 y pcDNA.	62
Tabla 17: Concentración de ARN extraído de las células transfectadas con NS5A y el control con pcDNA.	65
Tabla 18: Concentración de cDNA retrotranscrito a partir de ARN extraído de células transfectadas con NS5A y pcDNA.	66

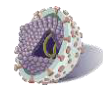
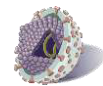
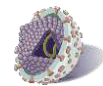


Tabla 19: Concentración de ARN extraído de las células transfectadas con Core y el control con pcDNA.	69
Tabla 20: Concentración de cDNA retrotranscrito a partir de ARN extraído de células transfectadas con Core y pcDNA.	69



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Infecciones virémicas por VHC (prevalencia y total de infectados) alrededor del mundo.	2
Figura 2: Frecuencia y distribución de los genotipos de hepatitis C en nuestro país.	4
Figura 3: Progresión de la hepatitis C.	5
Figura 4: Signos y síntomas de la cirrosis descompensada.	6
Figura 5: Genoma del Virus de la hepatitis C.	7
Figura 6: Proteínas del VHC y su localización en el retículo endoplásmico rugoso (RER) durante la replicación.	8
Figura 7: Ciclo viral del VHC.	9
Figura 8: Moléculas blanco de la terapia anti-VHC y sus AAD relacionados.	11
Figura 9: Representación esquemática del ciclo viral del VHC donde se muestran los blancos para la terapia antiviral.	13
Figura 10: Mecanismos de fibrosis hepática.	15
Figura 11: Transición epitelial-mesenquimal.	16
Figura 12: Tipos de TEM.	16
Figura 13: Relación entre los hallmarks del cáncer y las proteínas del VHC.	17
Figura 14: Diagrama de las funciones de FOXC1 en procesos fisiológicos y patológicos.	19
Figura 15: Vía de activación de FOXC1.	20
Figura 16: la IL8 induce la expresión de FOXC1 que da lugar a	21



metástasis a través de CCL2 y CXCR1.

Figura 17: Vía de clásica de Snai1. 22

Figura 18: Relación entre las proteínas virales y la vía de FOX. 24

Figura 19: Relación entre las proteínas virales y la vía de FOXC1 en CHC. 25

Figura 20: Estrategia general. 31

Figura 21: Esquema de la preparación de células calciocompetentes. 33

Figura 22: Esquema de la preparación de la transformación de células calciocompetentes. 34

Figura 23: Esquema de la preparación de células y la lisis alcalina. 35

Figura 24: Esquema de la recuperación de ADN plasmídico. 36

Figura 25: Esquema de la transfección transitoria. 41

Figura 26: Esquema de la extracción de ARN. 43

Figura 27: Diseño de plásmido de Core. 52

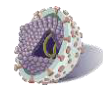
Figura 28: Vector de Expresión pcDNA3.1 (+). 53

Figura 29: Caracterización del plásmido de Core del VHC. 54

Figura 30: Extracción de los plásmidos pFK1, pNS5A y pcDNA. 55

Figura 31: Eficiencia de oligonucleótidos. 57

Figura 32: Comparación de la expresión a nivel transcripcional de 58



FOXC1 y SNAI1 entre las líneas celulares Huh7 y Huh7-VHC Replicón.	
Figura 33: Comparación de la expresión a nivel traduccional de FOXC1 y SNAI1 entre las líneas celulares Huh7 y Huh7-VHC Replicón.	60
Figura 34: Prueba de viabilidad de células Huh7.	61
Figura 35: Expresión de los genes de las proteínas no estructurales del VHC 24, 48 y 72 horas posteriores a la transfección con el plásmido Pfk1.	63
Figura 36: Expresión de FOXC1 y SNAI1 en células transfectadas con pFK1.	64
Figura 37: Expresión a nivel transcripcional del gen NS5A del VHC 24, 48 y 72 horas posteriores a la transfección con el plásmido NS5A.	67
Figura 38: Expresión de FOXC1 y SNAI1 en células transfectadas con NS5A.	68
Figura 39: Expresión a nivel transcripcional del gen Core del VHC 24 y 48 horas posteriores a la transfección con el plásmido Core.	70
Figura 40: Expresión de FOXC1 y SNAI1 en células transfectadas con Core.	71
Figura 41: Curva de calibración de proteínas con el método de Bradford.	72
Figura 42: Análisis a nivel traduccional de células transfectadas con los plásmidos pcDNA, NS5A, Core y pFK1.	73



RESUMEN

EFECTO DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FOXC1 Y SNAI1

Número de páginas:

Introducción: la hepatitis C es una enfermedad infectocontagiosa de etiología viral (VHC), la cual infecta a más de 185 millones de personas alrededor del mundo. Esta enfermedad es una de las principales causas de fibrosis, cirrosis, carcinoma hepatocelular y muerte relacionada al hígado en el mundo. Los mecanismos patológicos del VHC no han sido del todo dilucidados, pero se sabe que las proteínas virales interactúan con las vías de señalización celular y son capaces de inducir la transición epitelial mesenquimal (TEM) en los hepatocitos infectados, lo que podría estar relacionado con su actividad profibrótica y oncogénica. Es por ello que consideramos importante estudiar la relación entre el VHC y los factores de transcripción FOXC1 y SNAI1, considerados orquestadores de la TEM.

Materiales y Métodos: Se diseñó un plásmido que expresa la proteína Core del VHC, se caracterizó y se demostró su expresión a nivel transcripcional y traduccional en células Huh7 (hepatocarcinoma) transfectadas con el mismo. Se comparó la expresión a nivel transcripcional y traduccional de FOXC1 y SNAI1 en las líneas celulares Huh7 y Huh7-VHC Replicón, la cual expresa las proteínas no estructurales del VHC. Posteriormente se transfectaron células Huh7 con los plásmidos pFK1 (proteínas no estructurales), NS5A y Core estudiándose la expresión de FOXC1 y SNAI1 usando como control células Huh7 transfectadas con pcDNA.

Resultados: los resultados de la transfección transitoria con pFK1 y NS5A mostraron un incremento en la expresión de SNAI1 y una disminución en los niveles de expresión de FOXC1, la transfección con el plásmido de Core demostró la funcionalidad del plásmido y la expresión de Core en las células transfectadas demostró un incremento en la expresión de FOXC1 y una disminución en la expresión de SNAI1. Al comparar la expresión de FOXC1 y SNAI1 en las líneas celulares Huh7 y Huh7-VHC Replicón se encontró una sobreexpresión a nivel transcripcional de ambos genes y una disminución en la expresión a nivel traduccional en la expresión de SNAI1.

Conclusiones: El plásmido diseñado para la expresión de la proteína Core del VHC demostró su funcionalidad. Se observó que NS5A y el conjunto de las proteínas no estructurales del VHC son capaces de inducir una regulación a la alta a nivel transcripcional de FOXC1 y SNAI1 y una regulación a la baja de FOXC1. La expresión de la proteína Core induce una regulación a la alta de FOXC1 y una regulación a la baja de SNAI1. La línea celular Huh7-VHC Replicón la cual expresa las proteínas no estructurales del VHC mostro una mayor expresión a nivel transcripcional de FOXC1 y SNAI1, sin embargo también se observó una menor expresión a nivel traduccional de SNAI1.

Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una enfermedad infectocontagiosa con una elevada tendencia a la cronicidad, se produce tras la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) el cual posee tropismo selectivo por las células hepáticas. A pesar de que la mayoría de los pacientes pueden permanecer asintomáticos durante décadas, el daño hepático crónico resultante de la infección viral, dará lugar en última instancia a cirrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular (“OMS | Hepatitis C,” 2017).

Una vez que la enfermedad hepática sobrepasa la etapa de compensación, ésta puede generar hipertensión portal, coagulopatía, várices esofágicas y encefalopatía hepática. El costo de tratar esta aparatosa sintomatología en un enfermo crónico representa un gran peso para el sistema de salud y la familia (Y Tratamiento De La, n.d.).

Aunque están disponibles algunos fármacos que permiten detener la infección antes de su progreso, estos son extremadamente costosos y no se encuentran al alcance de del paciente promedio (Bryan-Marrugo et al., 2015).

Con el fin de generar nuevos tratamientos, es preciso dilucidar los mecanismos patológicos del virus, entender cómo interactúan las proteínas virales con las vías de señalización celular y cuál es el papel de esta interacción en el ciclo viral (Bandiera, Billie Bian, Hoshida, Baumert, & Zeisel, 2016).

En el presente estudio nos enfocamos en la interacción entre las proteínas virales (core y no estructurales) y los factores de transcripción FOXC1 y SNAI1.

1.1 Epidemiología

Se estima que más de 185 millones de personas en todo el mundo se encuentran infectadas por el VHC, de las cuales cada año mueren 350,000 (“OMS | Hepatitis C,” 2017). La incidencia, prevalencia y factores de riesgo de la infección varían considerablemente entre países, sin embargo la prevalencia es mayor en países de bajos y medianos ingresos (Shire & Sherman, 2015). En general esto se debe a un sistema sanitario deficiente, un incorrecto manejo de los productos sanguíneos, la carencia de métodos de diagnóstico y al difícil acceso a tratamiento. Sin embargo aún en países



desarrollados, el contagio en el medio hospitalario puede seguir siendo un asunto importante, en un estudio publicado en España entre los años 1998 y 2005 se encontró que el 67% de los pacientes infectados no tenían más factores de riesgo que el haber sido ingresados en un hospital en los últimos 6 meses (Martínez-Bauer et al., 2008).

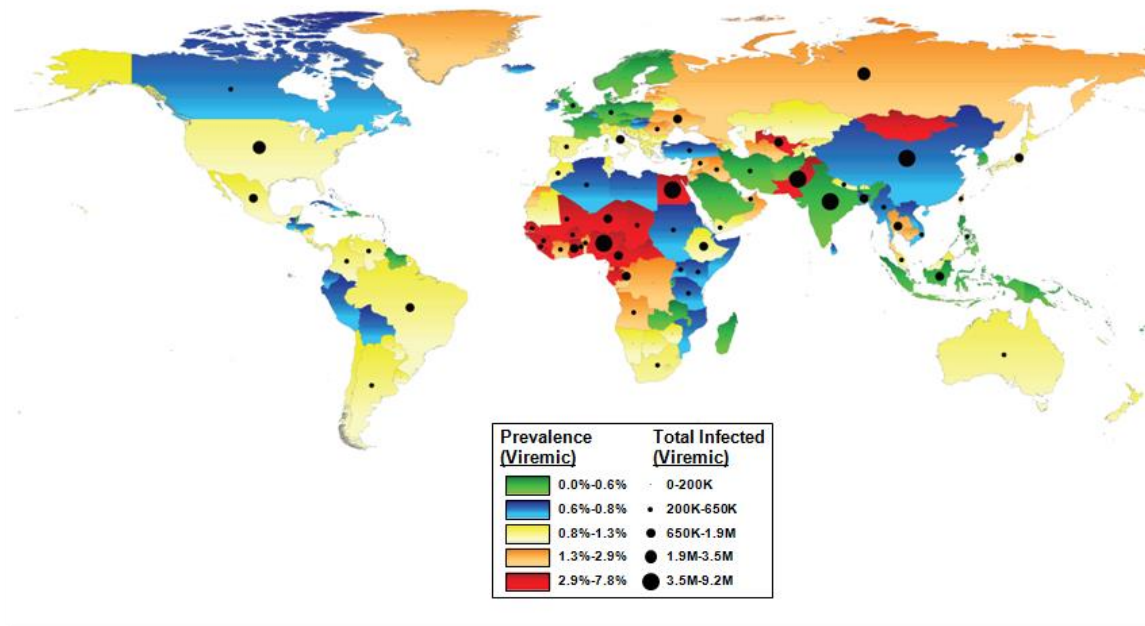


Figura 1: Infecciones virémicas por VHC (prevalencia y total de infectados) alrededor del mundo. Total de infectados y porcentaje de la población. (Del centro para el análisis de enfermedades (CDA). (“HCV Epidemiology - Summary Slides (updated January 19, 2015),” n.d.)

Actualmente se considera a la Hepatitis C como una de las principales causas de enfermedad hepática terminal, carcinoma hepatocelular (CHC) y muerte relacionada al hígado en el mundo. En la *tabla 1* se muestran las principales causas de cirrosis hepática y cáncer de hígado en el mundo, entre los años 1998 y 2013 (Vos et al., 2015).

A pesar de la existencia de diversos tratamientos antivirales no se puede considerar la erradicación del VHC, además a la fecha no se cuenta con una vacuna para prevenir su propagación. Actualmente el principal desafío, en los países en vías de desarrollo es que los tratamientos sean asequibles para los sujetos infectados (Lanini, Easterbrook, Zumla, & Ippolito, 2016a).



Cáncer de Hígado:	Antes de 1998	Entre 1998-2005	Entre 2006-2013	Total
Cáncer de hígado por hepatitis B	17.0%	17.6%	9.6%	24.5%
Cáncer de hígado por hepatitis C	17.6%	17.6%	10.1%	24.5%
Cáncer de hígado por consumo de alcohol	6.9%	9.6%	6.4%	11.2%
Cáncer de hígado por otras causas	3.7%	5.3%	4.3%	5.9%

Cirrosis Hepática:	Antes de 1998	Entre 1998-2005	Entre 2006-2013	Total
Cirrosis causada por hepatitis B	10.6%	6.9%	4.3%	14.9%
Cirrosis causada por hepatitis C	12.8%	7.4%	4.3%	16.5%
Cirrosis causada por consumo de alcohol	6.9%	5.3%	3.7%	9.6%
Cirrosis debido a otras causas	5.3%	5.3%	4.3%	8.5%

Tabla 1: Principales causas de cirrosis hepática y cáncer de hígado en el mundo, entre los años 1998 y 2013.

1.1.1 Vías de transmisión

En países en vías de desarrollo la transmisión ocurre principalmente de forma iatrogénica debido a trabajos dentales, cosméticos y a poca seguridad durante las transfusiones sanguíneas. En contraste con los países desarrollados donde la mayoría de las infecciones son causadas por exposiciones de alto riesgo en poblaciones específicas, como los usuarios de drogas intravenosas (Lanini et al., 2016a).

La vía de transmisión sexual no parece desempeñar un rol importante entre parejas heterosexuales donde la probabilidad de ser contagiado por contactos heterosexuales es de 1 en 190,000, (Terrault et al., 2013) (Lanini et al., 2016a) sin embargo han ocurrido múltiples brotes entre hombres homosexuales VIH positivos. Se han identificado varios factores de riesgo independientes en esta población, estos son: una carga baja de linfocitos CD4, uso de drogas intravenosas, relaciones sexuales sin protección, compartir juguetes sexuales y pajillas para uso de drogas inhalables (Vanhommerig et al., 2015) (Lanini et al., 2016a).

La transmisión vertical de madre a hijo es la ruta más común de transmisión en infantes con un riesgo de 6% y 11% en neonatos de mujeres infectadas (Lanini et al., 2016a).

1.1.2 Epidemiología en México

En México se estima que 1, 652,000 personas pueden estar infectadas por el VHC, con una incidencia de 19,300 casos nuevos por año. La prevalencia de la hepatitis C varía según la zona geográfica del país, 2% en el norte, 1.5% en el sur y 1.1 % en el centro



del país. Se calcula que 85% de los individuos infectados (1,404,200 mexicanos) padecen hepatitis crónica y la mitad de ellos desconoce su estado (Arrese et al., 2015).

En nuestro país, de 50 a 75% de los pacientes con hepatitis C se infectaron por transfusión de sangre o productos sanguíneos antes de 1995. Una forma de transmisión que merece especial atención es el uso de drogas intravenosas. Esta actividad se ha incrementado en los últimos años entre los jóvenes de 18 a 34 años, según los informes del Consejo Nacional Contra las Adicciones (CONADIC) (Arrese et al., 2015).

En nuestra población el genotipo más frecuente del virus es el 1 (70%) predominantemente, el subtipo b (figura 2) (Márquez-Rosales, Santoscoy-Tovar, & Montoya-Fuentes, 2008).

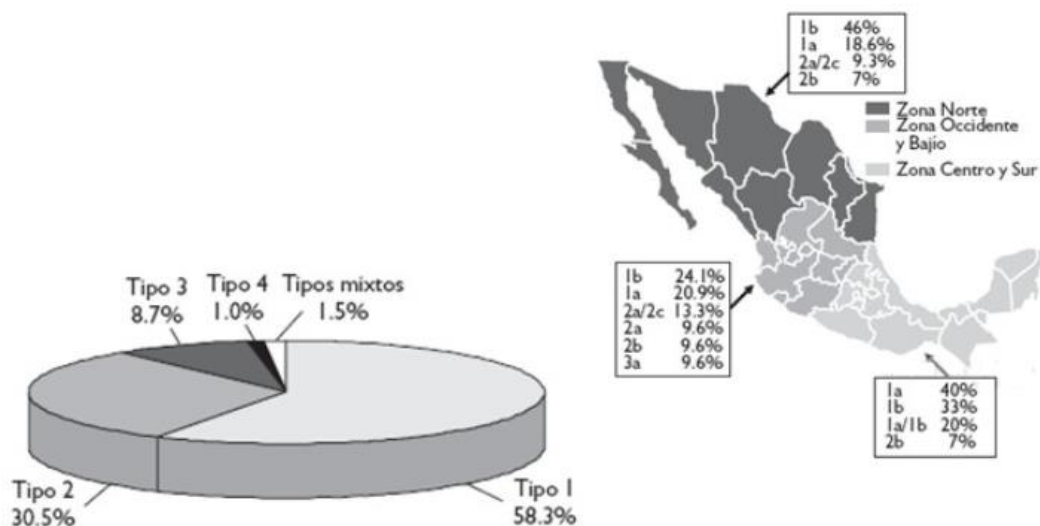


Figura 2: frecuencia y distribución de los genotipos de hepatitis C en nuestro país. (Márquez-Rosales et al., 2008)

1.2 Historia natural de la enfermedad

La historia natural de la hepatitis C crónica (HCC) es altamente variable. Después de décadas infectados con el virus los pacientes pueden presentar desde cambios mínimos, hasta fibrosis avanzada, cirrosis o carcinoma hepatocelular (Westbrook & Dusheiko, 2014). Las causas de las variaciones en el ritmo de progresión de la enfermedad aún no han sido esclarecidas (Preciado et al., 2014). De forma general se considera que tras la infección aguda, casi siempre asintomática, la mayoría de los pacientes (70-80%)



desarrollarán formas crónicas. Se considera una infección crónica a la persistencia de ARN viral en la sangre durante al menos 6 meses posterior a la primoinfección. Tras 25 a 30 años de la enfermedad un 5 a 25% de los pacientes presentaran cirrosis y un 1 a 3% carcinoma hepatocelular (Figura 3) (Manns et al., 2010).

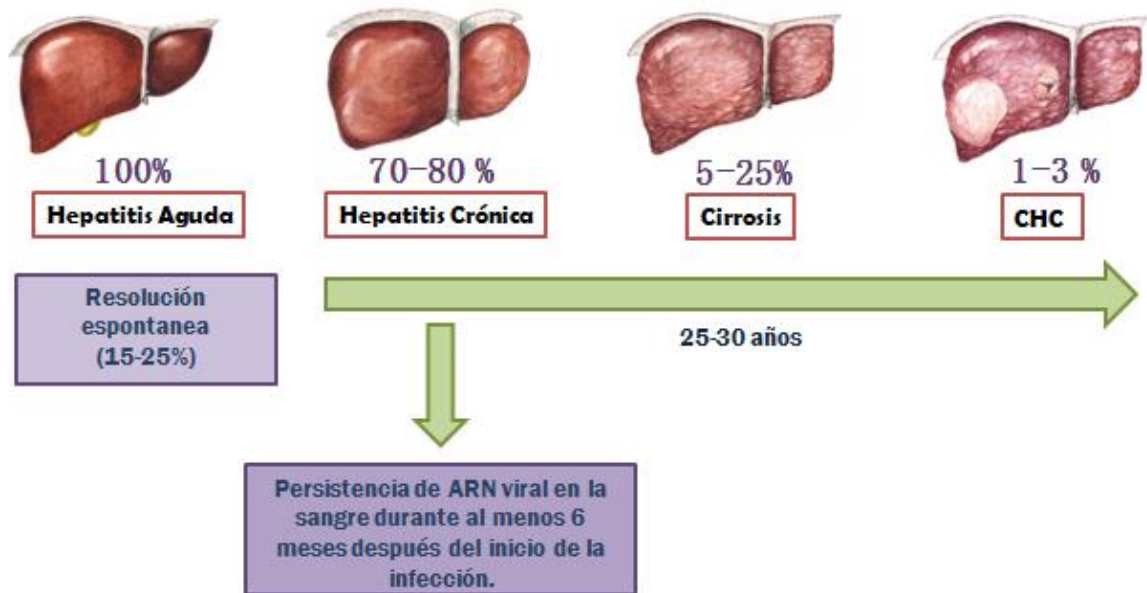


Figura 3: Progresión de la hepatitis C. Tras una infección aguda casi siempre asintomática hasta un 80% de los pacientes desarrollará hepatitis crónica, a lo largo de 25 a 30 años hasta un 25% desarrollara cirrosis y hasta un 3% desarrollara carcinoma hepatocelular.

1.2.1 Cuadro clínico

La infección por el VHC comienza con una fase aguda. La cual generalmente no se diagnostica porque pocas veces provoca síntomas. Cuando los signos y síntomas se manifiestan, pueden incluir ictericia, fatiga, náuseas, fiebre y dolores musculares. Los síntomas agudos aparecen de uno a tres meses después de la exposición al virus y duran de dos semanas a tres meses. (“Hepatitis C - Síntomas y causas - Mayo Clinic,” n.d.)

Tras la fase aguda un 80% de los pacientes desarrollan hepatitis crónica, finalmente el daño hepático crónico dará lugar a un proceso difuso de fibrosis y la conversión de la arquitectura normal en una estructura nodular anormal. En la evolución de la enfermedad, podemos distinguir dos fases: cirrosis compensada y descompensada. Esta



diferenciación tiene en cuenta que los pacientes hayan o no desarrollado las complicaciones propias de la enfermedad.(Y Tratamiento De La, n.d.)

La cirrosis compensada puede ser asintomática (40%) o manifestarse con datos inespecíficos como: anorexia, pérdida de peso, debilidad, fatiga y osteoporosis. La exploración física en esta etapa puede ser también inespecífica. Un importante número de pacientes que todavía no han sido diagnosticados se encuentran en esta fase(Y Tratamiento De La, n.d.).

Una vez establecida la enfermedad descompensada se presentan un serie de síntomas como; ictericia por la elevación de bilirrubina en la sangre, ascitis debido a la deficiencia en la síntesis de albumina, encefalopatía hepática por acumulación de sustancias no depuradas por el hígado, coagulopatía por deficiencia en la síntesis de factores de coagulación, hemorragia digestiva por varices esofágicas subsecuentes a la hipertensión portal, ginecomastia por disminución en la aromatización de la testosterona, entre otros(Y Tratamiento De La, n.d.).



Figura4: Signos y síntomas de la cirrosis descompensada. El daño hepático crónico entre sus muchos signos y síntomas genera ascitis por la disminución en la síntesis de albumina, hipertensión portal que puede manifestarse como cabeza de medusa, ginecomastia en varones por la disminución en la aromatización de testosterona, ictericia por aumento de la bilirrubina, asterixis por encefalopatía hepática y equimosis secundarias a coagulopatía.



1.3 El Virus de la hepatitis C

Como se mencionó anteriormente el agente etiológico de la hepatitis C es el VHC, un virus de ARN monocatenario de cadena positiva, perteneciente a la familia *flaviviridae*, género hepacivirus, de 30 a 60 nanómetros de diámetro con una envoltura lipídica de doble capa y una nucleocápside icosaédrica.

El virus posee un genoma de 9.6 kb (figura 5), con un marco único de lectura (MUL) flanqueado por dos regiones no codificantes (RNC). En la región 5' se localiza el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), esencial para la traducción independiente de las proteínas virales. El ORF da lugar a una poliproteína de 3000 aminoácidos que es procesada para dar lugar a tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y siete proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Preciado et al., 2014).

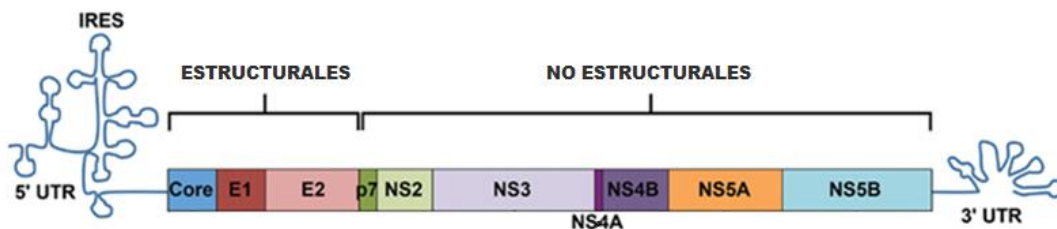


Figura 5: Genoma del Virus de la hepatitis C. Se observa el marco único de lectura (MUL) que dará lugar a las tres proteínas estructurales del virus y a las siete proteínas no estructurales, el MUL está flanqueado por dos regiones no codificantes en la región cinco prima se encuentra el IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) necesario para la traducción independiente de las proteínas virales (Preciado et al., 2014).

1.3.1 Función de las proteínas virales

Brevemente las funciones de las proteínas virales son las siguientes:

- Core: conforma la cápside del virus.
- Las proteínas E1 y E2: son proteínas altamente glicosiladas que participan en la entrada del virus a la célula.
- P7: posee actividad de canal iónico importante para la liberación del virus.
- NS2: es una autoproteasa con actividad cisteína proteasa.
- NS3: es una proteína multifuncional con actividad serina proteasa que al interactuar con NS4A tiene actividad NTPasa/helicasa.
- NS4A: actúa como cofactor de NS3 e induce la formación de la red membranosa.



-NS5A: es una fosfoproteína que puede encontrarse en dos formas fosforilada o hiperfosforilada, probablemente el estado de fosforilación modula la eficiencia de la replicación.

-NS5B: es la ARN polimerasa dependiente de ARN(Manzanares Ibañez, 2011).

En la figura 6 se describe la localización de las proteínas virales durante la replicación.

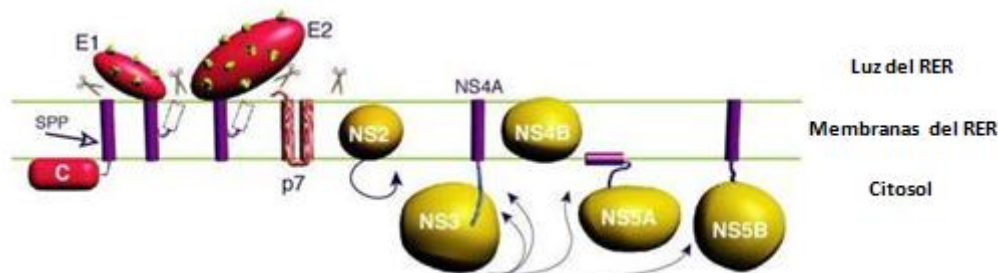


Figura 6: Proteínas del VHC y su localización en el retículo endoplásmico rugoso (RER) durante la replicación. Las proteínas E1 y E2 se localizan en la luz del RER, las proteínas Core, p7, NS2, NS4A y NS4B se localizan en la membrana del RER mientras que las proteínas NS3, NS5A y NS5B se localizan en el citosol.

1.3.2 Ciclo viral

La figura 7 ilustra brevemente el ciclo viral del VHC. Tras la entrada al organismo las partículas virales viajan en la sangre asociadas con lipoproteínas de baja densidad. La infección inicia con interacciones de baja intensidad entre las partículas virales y los proteoglicanos de la superficie del hepatocito, también participan el receptor de LDL y SR-B1 que se une a la proteína E2 del virus. A esto le sigue una unión más específica entre la proteína E2 y CD81 que induce una remodelación en la actina que facilita el movimiento lateral del complejo CD81-VHC hacia las uniones comunicantes, una vez ahí el virus interactúa con la Claudina 1 y la Ocludina lo que provoca una endocitosis mediada por clatrina.

El descenso del pH dentro del endosoma provoca la liberación del ARN viral en el citoplasma el cual viaja hacia el retículo endoplásmico rugoso (RER). Dirigido por el IRES, se traduce directamente dando lugar a una única proteína que es procesada por proteasas celulares y virales dando lugar a las proteínas estructurales (core, E1 y E2) y no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B)(Colpitts & Baumert, 2016).



Las proteínas virales forman el complejo de replicación. Dentro de este complejo, el ARN de polaridad positiva es copiado a un ARN complementario de polaridad negativa, que sirve de molde para la síntesis de ARN genómico de polaridad positiva. Estos ARN de polaridad positiva servirán para la síntesis de nuevos ARN complementarios negativos, para la traducción o serán encapsidados.

El modelo actual de ensamblaje de las partículas virales postula que las nucleocápsides formadas en el citoplasma adquieren la envuelta de glucoproteínas mientras brotan a través del retículo endoplásmico. Una vez ensambladas, las partículas del VHC son liberadas a través de la vía de secreción celular (Koutsoudakis, Forns, & Pérez-del-Pulgar, 2013).

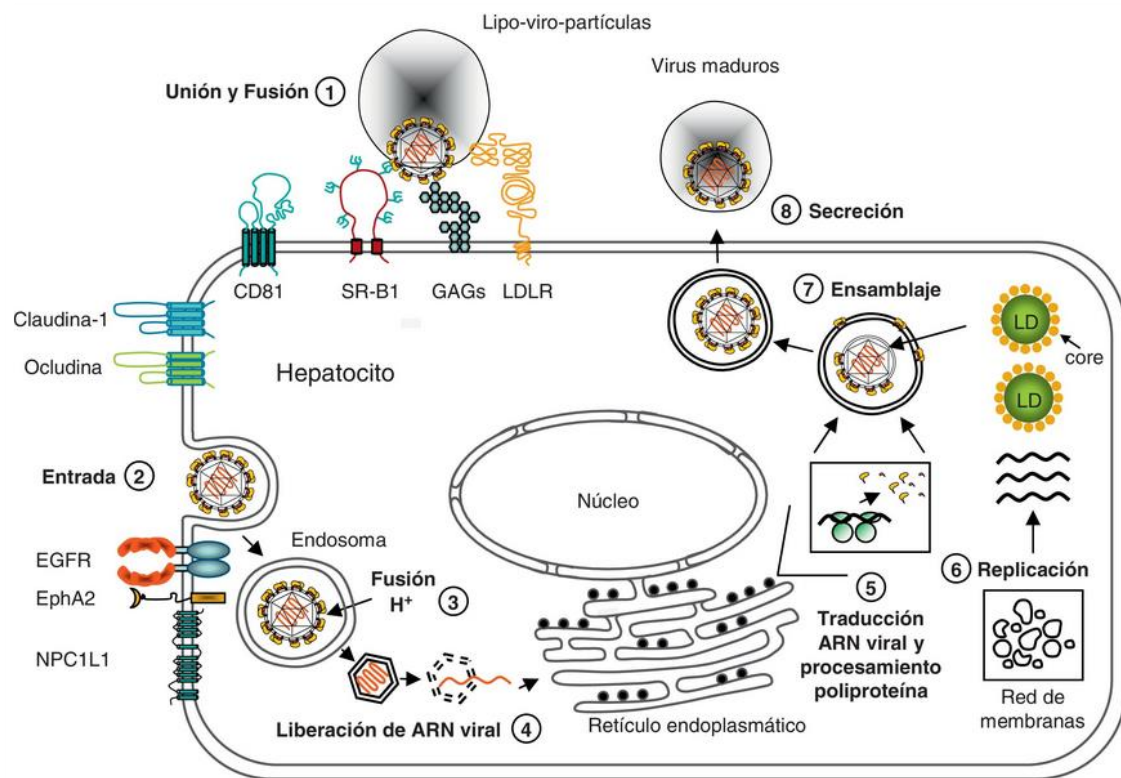
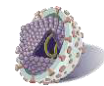


Figura 7: Ciclo viral del VHC. 1) Interacción inicial 2) Endocitosis. 3) La fusión de la envuelta del virus con la membrana del endosoma. 4) Liberación del ARN viral. 5) Traducción del ARN viral. 6) Replicación. 7) Formación de la cápside. 8) Liberación del virus (Koutsoudakis et al., 2013).

1.4 Tratamiento

No existe una vacuna para prevenir la infección por el VHC. En 1990 se propuso por primera vez la ribavirina para tratar la infección y el primer ensayo clínico para la



evaluación de su eficacia comenzó en 1991. La terapia antiviral combinada de interferón pegilado y ribavirina (RIV y PEG-IFN) se convirtió en el estándar de atención para esta enfermedad, y a pesar de sus deficiencias (efectos secundarios no deseados y 50% de recaída) permaneció como tal por más de 15 años.

1.4.1 Antivirales de acción directa

No fue sino hasta el 2011 que la mejor comprensión del ciclo de viral llevó al descubrimiento, evaluación y aprobación de los primeros agentes antivirales de acción directa (AAD) que se dirigen selectivamente al virus, estos fueron Telaprevir y Boceprevir, inhibidores de la proteasa, que reducen efectivamente la carga viral en pacientes con infección crónica por VHC. Poco a poco se han agregado nuevos AAD a esta lista: simeprevir (inhibidor de proteasa), sofosbuvir (inhibidor de la polimerasa NS5B), daclatasvir (inhibidor de la proteína NS5A) y faldaprevir (inhibidor de la proteasa NS3 / 4A), todos ellos mostrando resultados muy prometedores y algunos incluso han sido propuestos como la columna vertebral del tratamiento para las terapias contra el VHC, libres de interferón. En la tabla 2 se muestran las opciones terapéuticas para la hepatitis C.

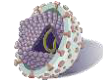
Medicamento	Duración
Simeprevir + pegIFN + RBV	24-48 semanas
Sofosbuvir + pegIFN + RBV	12 semanas
Faldaprevir + pegIFN + RBV	24-48 semanas
Daclatasvir + pegIFN + RBV	24 semanas
Asunaprevir + daclatasvir + pegIFN + RBV	24 semanas
Sofosbuvir + RBV (INF-intolerante o no elegible, pretrasplante)	24 semanas, hasta THO
ABT-450/r** + ombitasvir + dasabuvir ± RBV	12 semanas
Sofosbuvir + simeprevir ± RBV (off label*)	12 semanas
Sofosbuvir + faldaprevir ± RBV (off label*)	12 semanas
Sofosbuvir + daclatasvir ± RBV (off label*)	12-24 semanas
Sofosbuvir + ledipasvir dosis fija combinada ± RBV	8-12 semanas

Tabla 2: opciones terapéuticas para el VHC genotipo 1 disponibles en el mundo en el 2014-2015 (Tagle Arróspide & Bussalleu Rivera, 2015).

Fuente: Pawlotsky²³

* Por fuera de las indicaciones aceptadas

** Potenciado con ritonavir



En la actualidad, varios AAD (incluidos los inhibidores de la proteasa del VHC, los inhibidores de la polimerasa y los inhibidores de la NS5A) se encuentran en diversas etapas de desarrollo clínico (figura 8). Las investigaciones actuales intentan mejorar la farmacocinética y la tolerabilidad de estos agentes, definir los mejores regímenes y determinar estrategias de tratamiento que produzcan los mejores resultados.

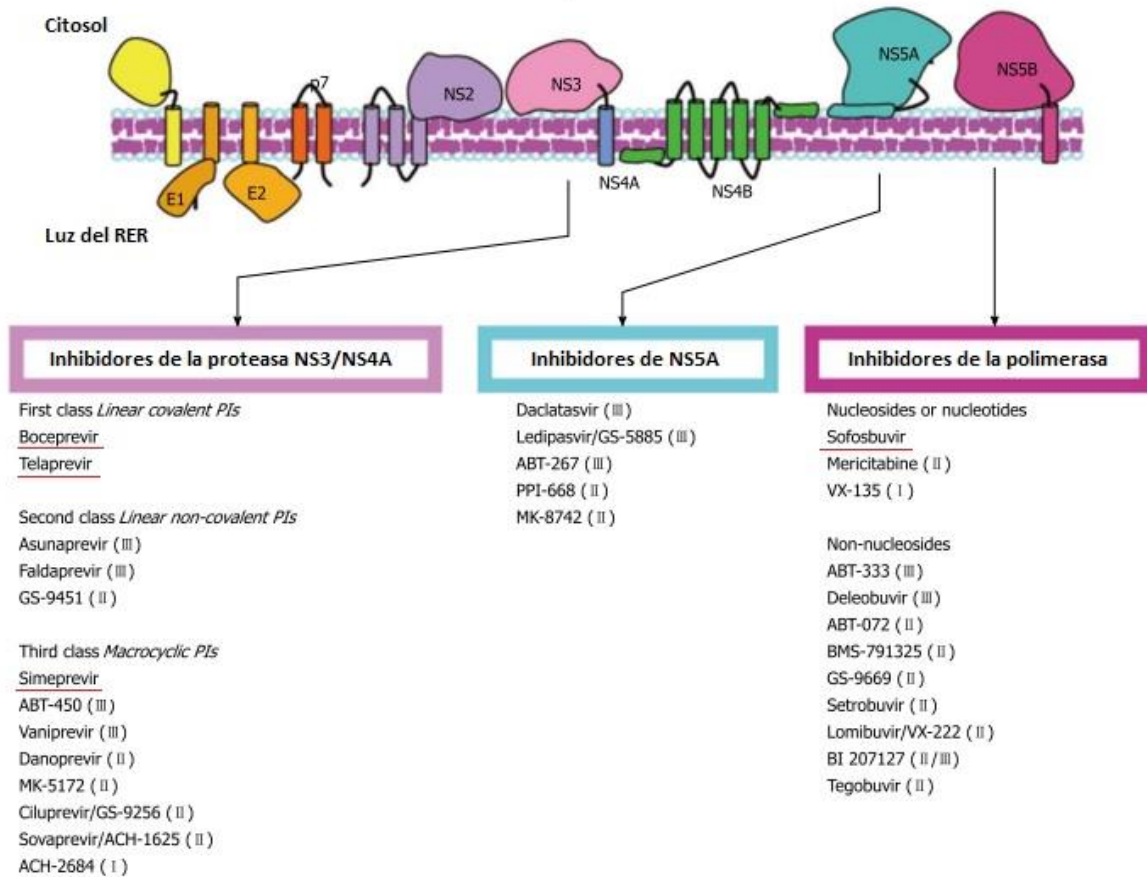
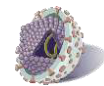


Figura 8: Moléculas blanco de la terapia anti-VHC y sus AAD relacionados. Los AAD se dividen en inhibidores de la proteasa NS3/NS4A, inhibidores de NS5A e inhibidores de la polimerasa (NS5B). A cada una de estas familias pertenecen diversos fármacos, los números romanos indican la fase de ensayo clínico en que se encuentran, aquellos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration de los Estados Unidos de America) se muestran subrayados en rojo (Preciado et al., 2014).

La posibilidad de resistencia a los AAD fue motivo de preocupación debido a la alta variabilidad genética del VHC, sin embargo se considera poco frecuente en los AAD



recientemente aprobados como el sofosbuvir, a pesar de ello se ha descrito (M. B. Zeisel & Baumert, 2017).

1.4.1.1 Los AAD y el CHC

Recientemente se ha establecido un debate sobre el efecto de los AAD sobre la aparición de carcinoma hepatocelular (CHC), ya en los tratamientos antiguos RIV y PEG-IFN se considera que aun los pacientes que alcanzaban la respuesta viral sostenida (RVS) presentaban una mayor probabilidad de desarrollar CHC que la población general. En esto fue atribuido principalmente al daño hepático crónico, aunque algunos autores han señalado la probabilidad de que el VHC induzca la aparición de una firma molecular en la célula infectada, mediante la alteración del transcriptoma, que favorezca la replicación viral favoreciendo la carcinogénesis como efecto colateral (Baumert, Jühling, Ono, & Hoshida, 2017)(Ono et al., 2017). Esto vuelve indispensable estudiar los mecanismos que pudieran favorecer estas alteraciones.

A partir del año 2016 hasta la actualidad se han realizado diversos estudios considerando la posibilidad de que los AAD favorezcan la aparición de CHC aun en aquellos pacientes que logran la RVS (Zeng et al., 2016)(C.-F. Huang et al., 2017). Se ha observado una mayor incidencia y prevalencia de CHC en pacientes tratados con AAD en comparación con aquellos que logran la curación espontánea de la infección y los tratados con PEG-IFN, sin embargo todos estos han sido pequeños estudios retrospectivos. Para esclarecer este asunto idealmente se deberían realizar grandes estudios prospectivos multicéntricos, pero esto no ha sido posible, debido principalmente a que la terapia con AAD es relativamente nueva y costosa (Konjeti & John, 2018).

1.4.2 Agentes huésped-blanco

También vale la pena mencionar que diferentes líneas de investigación están evaluando otras formas de mejorar el tratamiento de los pacientes infectados con el VHC. Un ejemplo son los antivirales que interfieren con los factores celulares implicados en la infección, es decir, agentes huésped-blanco (AHB) (figura 9)(Bryan-Marrugo et al., 2015).



Al actuar a través de un mecanismo de acción complementario y al exhibir una barrera generalmente más alta a la resistencia, los AHB pueden asociarse con AAD para prevenir la resistencia viral. De hecho, dado su mecanismo de acción complementario, las AHB y los AAD pueden actuar de forma sinérgica para reducir la carga viral (M. B. Zeisel, Lupberger, Fofana, & Baumert, 2013).

Varias AHB están actualmente en desarrollo en ensayos preclínicos o clínicos. Los estudios sobre alisporivir y miravirsén ya han mostrado tasas de curación muy altas en los ensayos clínicos de fase 2 y 3 cuando se usan en monoterapia. Los estudios preclínicos también han demostrado la posible actividad sinérgica de las combinaciones AHB/AAD para curar la infección por VHC. La sinergia entre los AAD y las AHB ofrece una opción prospectiva para las terapias combinadas.

Es por eso que los AHB pueden ampliar el arsenal terapéutico contra la infección crónica por VHC y simplificar la terapia contra el VHC (M. Zeisel, Crouchet, Baumert, & Schuster, 2015). Esta es una de las razones por las que se vuelve indispensable comprender los factores celulares implicados en la infección por el VHC.

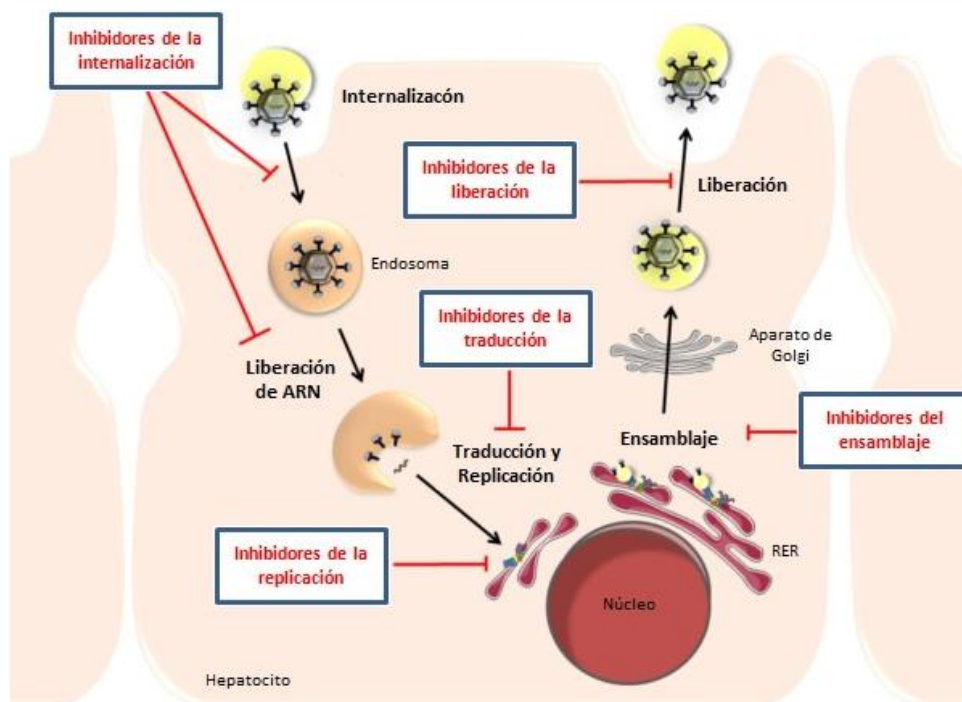
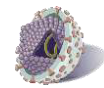


Figura 9: Representación esquemática del ciclo viral del VHC donde se muestran los blancos para la terapia antiviral. Mientras que todos los AAD actúan inhibiendo la replicación viral los AHB pueden ejercer sus efectos durante la internalización (anticuerpos contra CD81, SRB-1 y CLD1), la replicación (inhibidores CpyA), el ensamblaje y la liberación pudiendo ejercer un efecto sinérgico al combinarse con los AAD (M. Zeisel et al., 2015).



1.5 Patogénesis

Si bien el conocimiento sobre la virología molecular de la infección por el VHC ha avanzado marcadamente, los mecanismos moleculares de la progresión de la enfermedad que conducen a la fibrosis, la cirrosis y el CHC aún no están claros (Bandiera et al., 2016).

1.5.2 El VHC y la fibrosis hepática

La fibrosis hepática se define como una acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular (PME) como colágeno, elastina, laminina y fibronectina. Es considerada una respuesta de cicatrización en la lesión hepática crónica. Su estadificación es indispensable para el establecimiento del pronóstico y manejo de la HCC (Sebastiani, Gkouvatzos, & Pantopoulos, 2014).

Entender los mecanismos subyacentes a la fibrogénesis hepática es primordial para el manejo y la prevención de la enfermedad hepática terminal. El VHC actúa directamente modulando las vías de señalización celular a través de las proteínas virales, además de indirectamente inducir la respuesta inmune promoviendo un estado de inflamación crónica. Ambos eventos actúan en conjunto dando lugar a la fibrosis hepática (Sebastiani et al., 2014).

1.5.2.1 TEM en la fibrogénesis Hepática

Los miofibroblastos se consideran elementos fibrogénicos clave en el desarrollo de la fibrosis hepática, estos sintetizan PME de forma constante, sin embargo el origen de los miofibroblastos es aún motivo de discusión. La evidencia señala que la fuente principal de miofibroblastos son las células estelares hepáticas (CEH) las cuales reaccionan al estímulo de citosinas profibroticas. Sin embargo existe evidencia de que otros precursores importantes pueden ser las células epiteliales hepáticas a través de la transición epitelial mesenquimal (TEM) (Lee, Kim, & Park, 2014). Algunos autores incluso señalan que las CEH podrían ser de hecho células epiteliales que atraviesan una TEM parcial (Choi & Diehl, 2009). o algún tipo particular de hepatocito precursor (figura 10) (Yang et al., 2008).

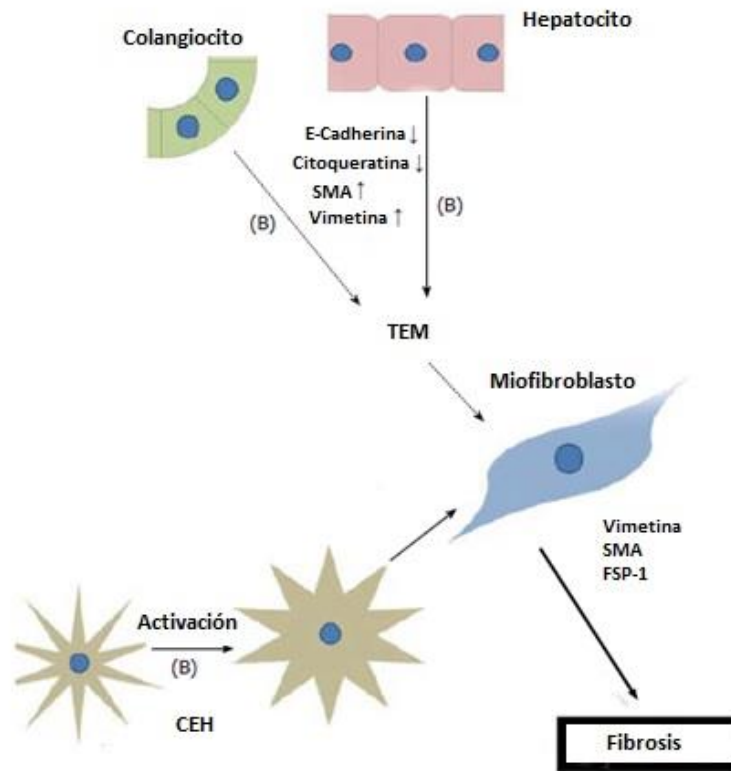


Figura 10: Mecanismos de fibrosis hepática. Los elementos fibrogénicos clave en el desarrollo de fibrosis hepática son los miofibroblastos la fuente principal de miofibroblastos son las células estelares hepáticas (CEH) , sin embargo las células epiteliales hepáticas y los colangiocitos participan a través de la TEM (Lee et al., 2014).

La TEM se caracteriza por un cambio rápido y a menudo reversible de fenotipo, las células epiteliales polarizadas que interaccionan con la membrana basal se vuelven aisladas móviles y resistentes a la apoptosis. La degradación de la membrana basal y la formación de células mesenquimales que pueden migrar mas allá de la capa epitelial que les dio origen son la señal de una TEM completa (figura 10)(Kalluri & Weinberg, 2009b).

Es bien sabido que la TEM es un proceso indispensable durante la implantación, embriogénesis y organogénesis. En estadios posteriores es un factor primordial para la reparación y cicatrización, sin embargo en respuesta a un daño crónico, como es el caso de la HCC, se relación con el desarrollo de fibrosis. Además la TEM se observa también



en los procesos neoplásicos donde facilita la diseminación metastásica (figura 11)(Angadi & Kale, 2015).

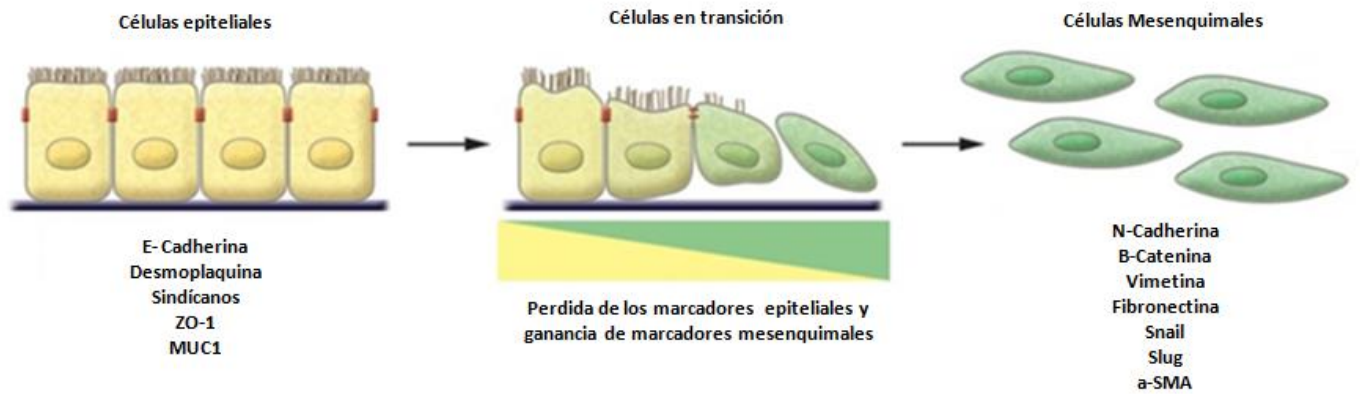


Figura 11: Transición epitelial-mesenquimal. Involucra un cambio funcional de células epiteliales polarizadas hacia células mesenquimales móviles secretoras de PME, se enlistan los diferentes sets de marcadores que son comúnmente utilizados para diferenciar ambos tipos celulares.



Figura 12: Tipos de TEM. El tipo uno es indispensable para el desarrollo embrionario, El tipo dos ocurre durante los procesos de cicatrización y se relación con la aparición de fibrosis, El tipo tres ocurre durante procesos neoplásicos y favorece la metástasis. Tanto la fibrosis como el cáncer forman parte de la historia natural de la infección por el VHC.



1.5.3 El VHC y el cáncer.

El VHC no integra su material genético en el genoma del huésped, y por lo tanto requiere una replicación continua para mantener la infección crónica. Muchos factores del huésped que desempeñan papeles esenciales en el ciclo de viral y la evasión inmune, sin embargo, la patogénesis de la enfermedad que finalmente desencadena el CHC a permanecido como un misterio. Cada vez más pruebas apuntan a que el VHC transmite señales y modula la expresión de genes en el hepatocito. Además, las proteínas virales se han involucrado en la interrupción de las vías de señalización que afectan la supervivencia celular, la proliferación y la transformación. Esto sugiere que las interacciones entre el virus y el huésped durante la infección viral contribuyen a la transformación celular y al desarrollo de CHC directamente a través de las proteínas del virus (Bandiera et al., 2016). En la figura 13 se muestra la relación entre las proteínas virales y los diferentes hallmarks del cáncer.

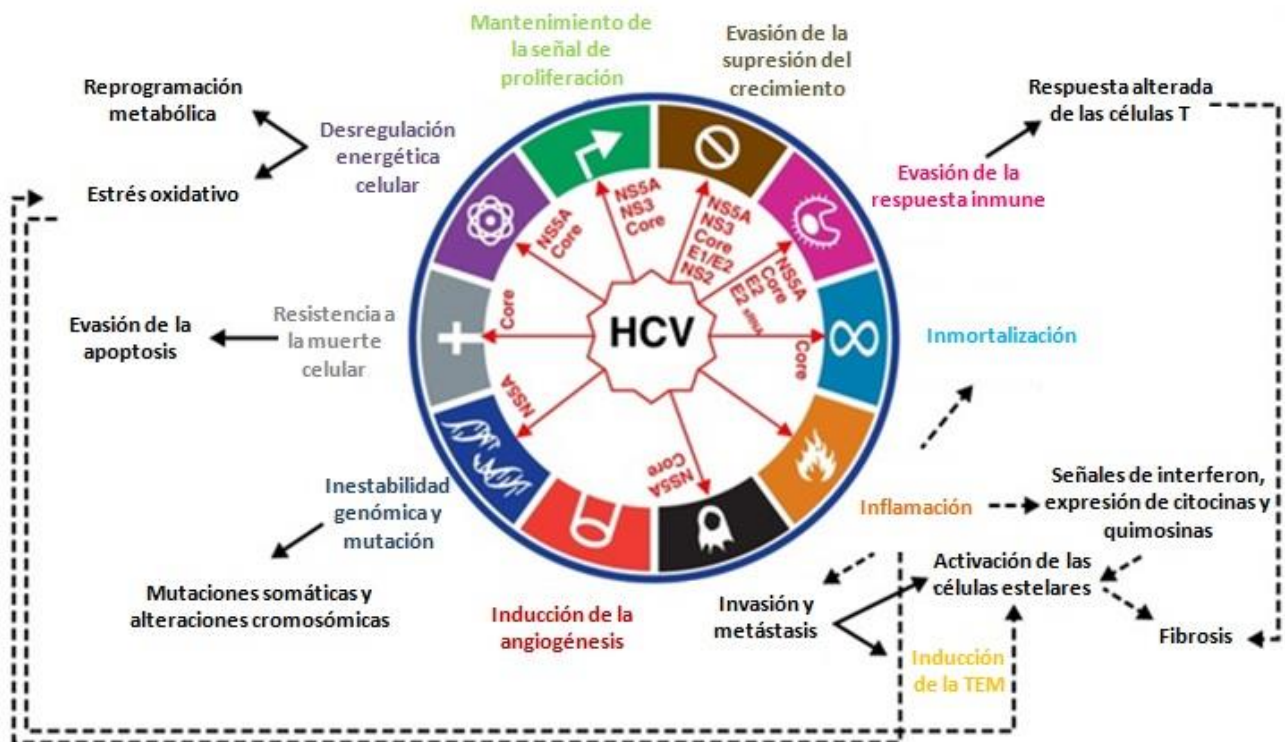


Figura 13: Relación entre los hallmarks del cáncer y las proteínas del VHC. Las diferentes proteínas virales se relacionan cada una con diferentes hallmarks del cáncer como son la inmortalización, inflamación, evasión del sistema inmune, supresión del crecimiento, mantenimiento de la señal de proliferación, desregulación energética celular, resistencia a la muerte celular, mutación, inducción de la angiogénesis, invasión y metástasis e inducción de la transición epitelial-mesenquimal (TEM). Obsérvese la relación entre la TEM, la metástasis y la fibrosis. (Bandiera et al., 2016)



1.8 El VHC y la TEM

Como se mencionó con anterioridad la TEM se relaciona con las dos principales patologías observadas en la historia natural de la hepatitis C, la fibrosis hepática y la carcinogénesis (Lee et al., 2014). Es más la TEM inducida por el VHC podría no solo ser responsable del inicio del cáncer sino también de su progresión hacia la metástasis (Panbianco, Saracino, & Paziienza, 2014) (Bose, Meyer, Di Bisceglie, Ray, & Ray, 2012) (Iqbal et al., 2014).

Las proteínas virales que más se han relacionado con este proceso son la Core y NS5A, ya que inducen la expresión de TGF- β y SNA1 con la subsecuente regulación a la baja de los marcadores epiteliales y a la alta de los marcadores mesenquimales.

Por otra parte la regulación a la baja de algunos marcadores mesenquimales como son la Claudina1 y la Ocludina, ambas proteínas indispensables para la internalización del virus, se han sugerido como un mecanismo de exclusión de la superinfección, un proceso biológico en el que un virus evita la internalización de otros virus de la misma especie a la célula con el fin de evitar los efectos deletéreos de una superinfección (Liu et al., 2009) (Tscherne et al., 2007) (Schaller et al., 2007) (Li et al., 2016). De esta forma la TEM podría no ser un efecto colateral, sino un mecanismo que favorece la cronicidad de la infección.

1.6 FOXC1

El factor de transcripción FOXC1 un miembro vital de la familia FOX (forkhead box) que juega un papel importante en diversos procesos biológicos como son la proliferación diferenciación, apoptosis, migración e invasión (Jinhua Wang, Li, Zheng, Pang, & Du, 2018). Su expresión es indispensable durante el desarrollo embrionario para el desarrollo del cerebro, el corazón y los ojos (Han et al., 2017) sin embargo su expresión durante la vida adulta se ha visto relacionada con el desarrollo de diversos cánceres como es el caso del CHC (Jinhua Wang et al., 2018).

Ha sido demostrado que FOXC1 es capaz de inducir la TEM no solo en el CHC sino también en el cáncer de mama (Han et al., 2017) y cervicouterino (L. Huang et al.,



2017). Es por ello que quisimos saber si el VHC se vale de FOXC1 para inducir la TEM.

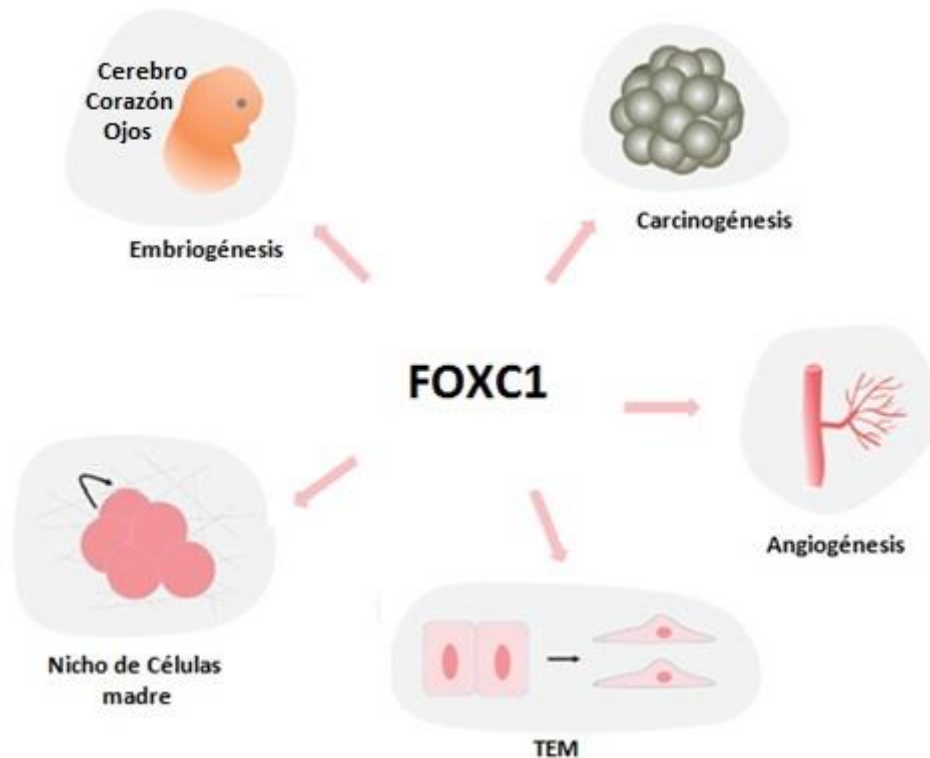


Figura 14: Diagrama de las funciones de FOXC1 en procesos fisiológicos y patológicos. La expresión de FOXC1 es indispensable durante el desarrollo embrionario para el desarrollo del cerebro, el corazón y los ojos, sin embargo su expresión durante la vida adulta se ha relacionado con el desarrollo de diversos cánceres como es el caso del CHC.

1.6.1 Regulación de FOXC1

A pesar de los extensos estudios funcionales en desarrollo embrionario y progresión tumoral, aún no se comprende del todo cómo se regula la expresión de FOXC1, especialmente en estados neoplásicos.

Los estudios principales se han concentrado esencialmente en el cáncer de mama, el modelo propuesto de activación en el cáncer de mama de tipo basal (BLBC) consiste en que el factor de crecimiento epitelial (EGF) activa a su receptor (EGFR), lo que conduce a la activación río abajo de las rutas mediadas por Ras y PI3K. Ras activado conduce a la posterior fosforilación y activación de ERK, mientras que PI3K activa a



Akt. La activación de ERK y Akt conduce a la fosforilación y activación de NF- κ B. NF-Kbfosforilada ingresa al núcleo donde se une a la región promotora de FOXC1 para regular positivamente la transcripción y la expresión proteica de FOXC1 (Chung et al., 2017). Además, FOXC1 regula al alza la actividad y la expresión de NF- κ B en células de BLBC, lo que en última instancia aumenta la proliferación celular, la migración y la invasión (Figura 12)(J Wang et al., 2012).

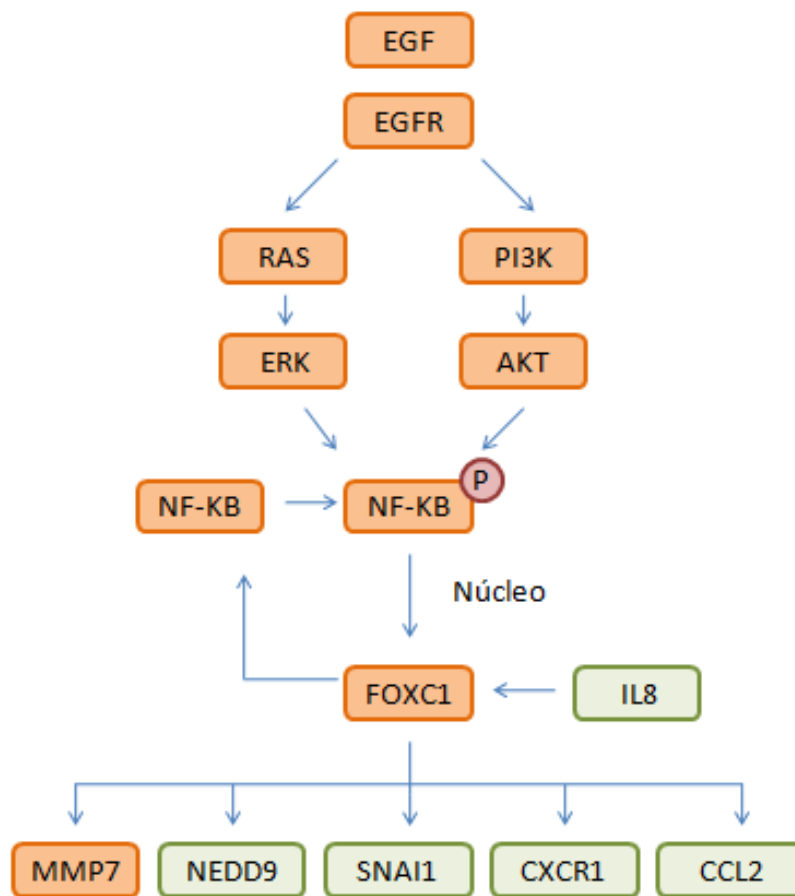


Figura 15: Vía de activación de FOXC1. En BLBC (naranja) y CHC (verde). En el BLBC la expresión de FOXC1 es inducida por la activación del receptor de factor de crecimiento epitelial (EGFR) a través de ERK/AKT que inducen la fosforilación de NF- κ B. El resultado de la expresión de FOXC1 es la regulación a la alta de las proteínas NF- κ B y MMP7. En el caso del CHC FOXC1 induce la expresión de NEDD9, SNAI1 y CCL2.

En cuanto al CHC se sabe que los cambios inducidos por la sobreexpresión de FOXC1 favorecen la transición epitelial-mesenquimal (TEM) y un aumento en la invasión de células cancerígenas y metástasis. Esto sucede debido a que FOXC1 transactiva la



expresión de SNAI1 al unirse directamente a su promotor, lo que lleva a la inhibición de la transcripción de E-cadherina,(Xia et al., 2013) además de NEDD9, un blanco transcripcional directo de FoxC1 y está involucrado en la invasión y metástasis de CHC mediada por FoxC1(Xia et al., 2013) (Figura 12).

Por otra parte la exposición de células de CHC a IL8 condujo a una expresión aumentada de FOXC1, a través de la activación de la señalización de PI3K, AKT y HIF1A(Figura 13).

CXCR1 y CCL2 fueron objetivos directos de transcripción de FOXC1. CCL2 genera un incremento en el infiltrado de macrófagos asociados a tumores (TAM), mientras que CXCR1 es un receptor de IL8 lo que genera un efecto de retroalimentación positiva, dando lugar en suma a un incremento en la metástasis(W. Huang et al., 2015).

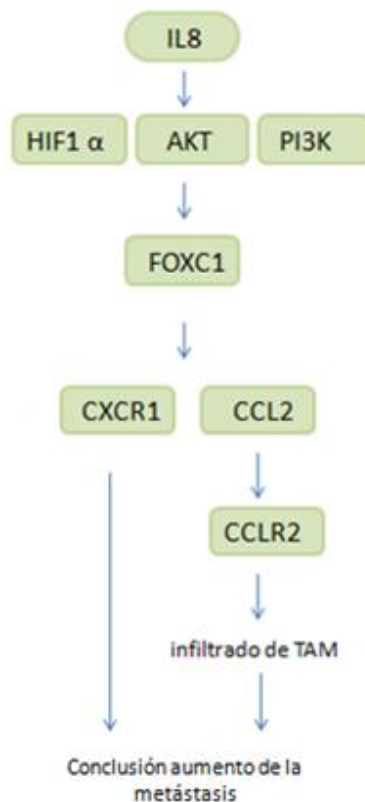


Figura 16: la IL8 induce la expresión de FOXC1 que da lugar a metástasis a través de CCL2 y CXCR1. La IL8 induce la expresión de FOXC1 lo que a su vez provoca una regulación a la alta de CXCR1 (receptor de IL8, efecto de retroalimentación positiva) y CCL2 (genera un infiltrado de macrófagos activados) esto nos lleva en conclusión un aumento de la metástasis.



1.7 Snai1

Anteriormente se mencionó que FOXC1 induce la expresión de SNAI1. Las funciones de la familia SNAIL, factores de transcripción del dedo de zinc, son esenciales durante el desarrollo embrionario. Una de las más conocidas es inducir la TEM (Barrallo-Gimeno, 2005).

La expresión de SNAI1 se lleva a cabo por diferentes vías, la más estudiada es la vía de TGF- β . En última instancia la expresión de SNAI1 causara una alteración de la polaridad celular, en este caso del hepatocito, lo que dará lugar a la expresión a la baja de los marcadores epiteliales y ala alta de los marcadores mesenquimales (figura 14).

Se sabe que el VHC es capaz de inducir la expresión de SNAI1 (Bose et al., 2012)(Nie et al., 2015)(Hu et al., 2017). En este trabajo exploramos la posibilidad de que FOXC1 sea un intermediario en la expresión de SNAI1 inducida por las proteínas virales (Core y no estructurales).

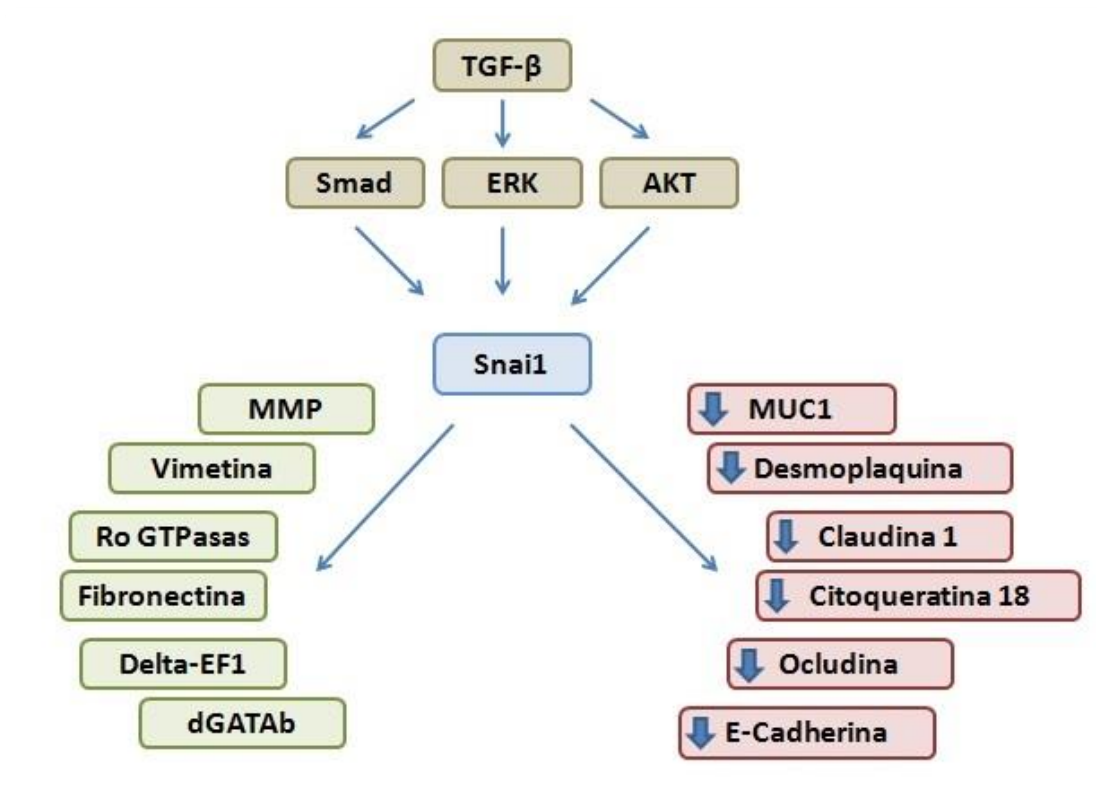
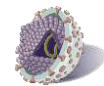


Figura 17: Vía de clásica de Snai1. La expresión de Snai1 regula a la alta la expresión demarcadores mesenquimales (verde) y a la baja a de marcadores epiteliales (rojo)



CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES

A la fecha no se cuentan con antecedentes del estudio de la interacción directa de las proteínas del VHC con el factor de transcripción FOXC1, sin embargo si se ha observado la interacción con algunos miembros de la vía, como se observa en las figuras 15 y 16.

Como ya se ha comentado, la vía de inducción de FOXC1 ha sido principalmente estudiada en cáncer de mama, En la figura 15 se observa esta vía de color anaranjado. Partiendo de este punto se ha buscado información en la literatura que relacione a los participantes de esta vía con las diferentes proteínas del VHC (color morado). Encontrándose que NS5A interactúa con el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) inhibiendo su degradación (fig. 15A), mutaciones en NS5A que dificulten esta interacción generan una disminución en la cronicidad de la enfermedad en modelos animales. No se sabe si esta interacción podría desencadenar la expresión de FOXC1, sin embargo se sabe que la TEM, uno de los efectos de la expresión de FOXC1, favorece la cronicidad de la enfermedad al generar un efecto de evasión de la superinfección (Igloi et al., 2015).

Por otro lado, la proteína Core del VHC activa al factor nuclear KB (NF-KB) cuya expresión favorece la carcinogénesis a través de la inhibición de TNF-a (fig.15B). En cuanto a la vía de FOXC1 se sabe la expresión de NF-KB genera un bucle que permanece mientras exista una inducción de la fosforilación de este último (Tai et al., 2000).

De forma independiente esta descrito que la proteína Core interactúa con SNAI1, efector de FOXC1 (Nie et al., 2015). La activación de Snai1 por las proteínas virales, NS4B y Core, favorece la TEM (Li et al., 2016).

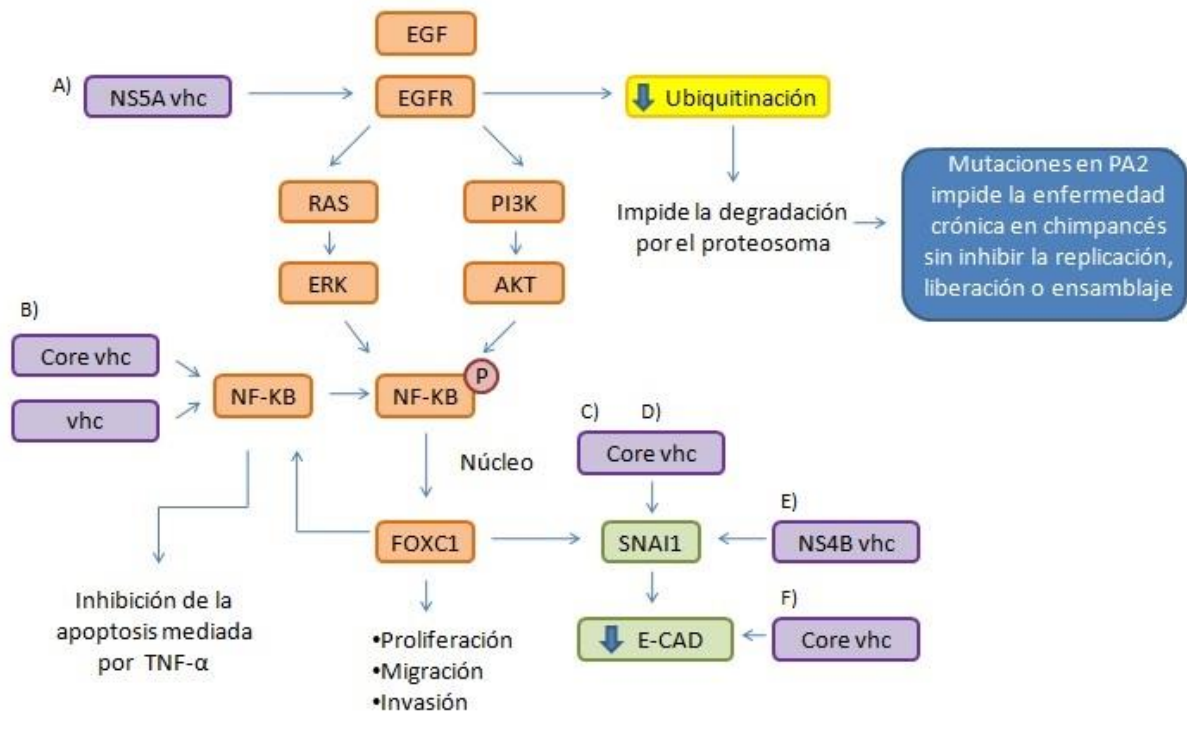


Figura 18: Relación entre las proteínas virales y la vía de FOX. La vía clásica de FOXC1 se muestra en color anaranjado donde EGFR induce la expresión de FOXC1 a través de la vía RAS-PI3K, en color verde su implicación con el hepatocarcinoma donde FOXC1 induce la expresión de SNAI1 y en color morado se muestran las proteínas de VHC en los sitios que podrían estar interaccionando NS5A con EGFR, NS4B con SNAI1 y Core con NF-KB, SNAI1 y E-cadherina.

La expresión de FOXC1 también ha sido estudiada en carcinoma hepatocelular sin tomar en cuenta su etiología donde se ha observado que FOXC1 induce la expresión de Snai1 lo cual favorece la metástasis y disminuye la supervivencia de los pacientes (Polyak, 2001). Como ya se ha mencionado, las proteínas Core y NS5A inducen la expresión de Snai1 pero se desconoce si esta inducción se da a través de FOXC1 (Fig.16).

Además se sabe que la IL8 favorece la aparición de metástasis en CHC esto a través de la activación de la vía de FOXC1 (Fig. 16 color verde). Una vez más de forma independiente se sabe que las proteínas Core y NS5A inducen la expresión de IL8 (Clément et al., 2010).

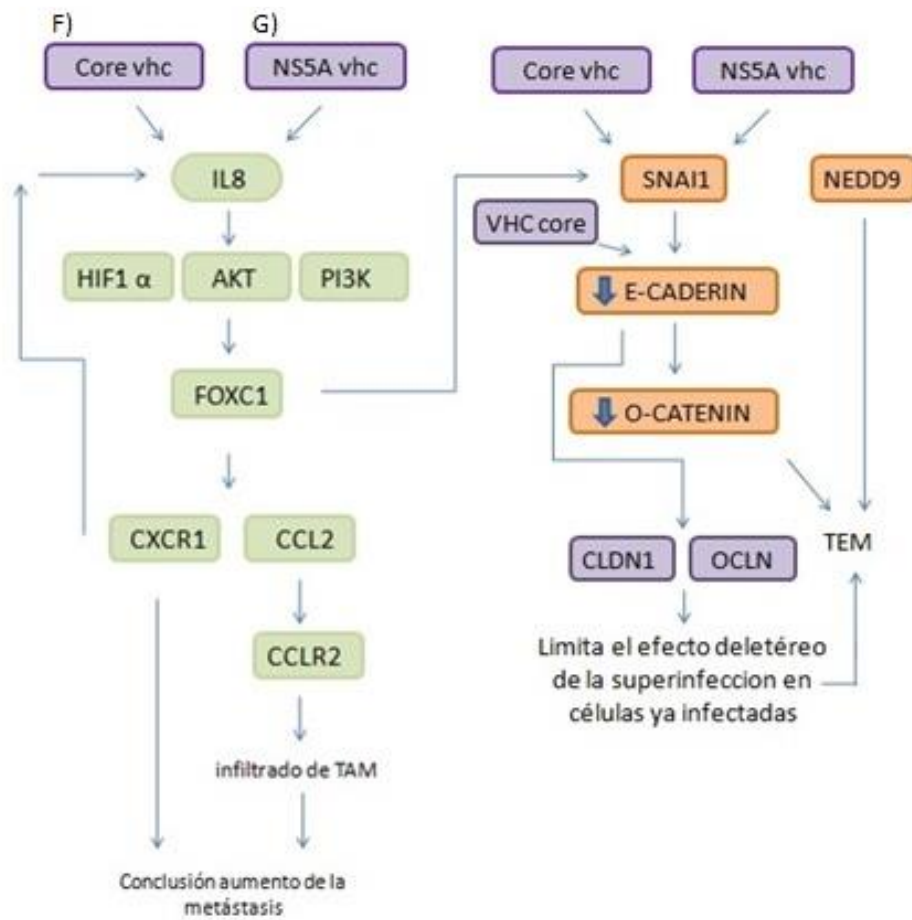


Figura 19: Relación entre las proteínas virales y la vía de FOXC1 en CHC. En color verde se muestra la vía de FOXC1 implicada con el CHC su relación con SNAI1 y en color morado se muestran las proteínas del VHC y los sitios de probable interacción.



CAPÍTULO 3: JUSTIFICACION

Como se mencionó anteriormente, el VHC es capaz de desencadenar la TEM en los hepatocitos infectados, ya sea que este proceso sea un efecto colateral o favorezca la cronicidad de la infección, sus efectos a largo plazo han sido relacionados con el desarrollo de las principales patologías observadas en los pacientes que padecen la infección crónica, fibrosis y CHC. Es por ello que decidimos estudiar la relación entre la expresión de las proteínas virales y dos factores de transcripción fuertemente implicados en este fenómeno, FOXC1 y SNAI1, ya que esto permitirá una mejor comprensión de cómo el virus usa la maquinaria celular para completar su ciclo infeccioso y los efectos patológicos concomitantes.



CAPÍTULO 4: OBJETIVOS

General:

Estudiar el efecto del VHC en expresión de los factores de transcripción *FOXC1* y *SNAI1* durante la replicación viral.

Específicos:

1-Generar un plásmido que exprese la proteína Core-VHC (estructural) para analizar y comparar el efecto de proteínas estructurales y no estructurales del VHC en los niveles de expresión de *FOXC1* y *SNAI1*.

2-Evaluar el efecto a nivel transcripcional de la expresión de las proteínas no estructurales y Core del VHC en los genes *FOXC1* y *SNAI1* en las células Huh7.

3-Evaluar el efecto a nivel traduccional de la expresión de las proteínas no estructurales y Core del VHC en *FOXC1* y *SNAI1*.



CAPÍTULO 5: MATERIALES

5.1 Reactivos

5.1.1 Reactivos de uso general

1. Alcohol etílico (Jalmek)
2. Alcohol metílico (MERK)
3. Alcohol Isopropílico (MERK)
4. SDS (Sigma Aldrich)

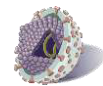
5.1.2 Cultivo celular

Los reactivos utilizados para cultivo celular son de la marca Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA):

1. Aminoácidos no esenciales (10mM 100X)
2. Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM)
3. L- Glutamina (200 mM 100X)
4. Suero Fetal Bovino (FBS)
5. Tripsina-EDTA (0.25%)
6. Solución de antibiótico-penicilina-estreptomicina (100UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina)
7. PBS 1X pH 7.4 (Gibco)
8. Colorante Azul Tripano 0.4% (Invitrogen)
9. Glicerol (Sigma Aldrich)

5.1.3 Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR)

1. TRIzol® (Invitrogen)
2. Cloroformo (J.T. Baker)



3. Isopropanol (MERK)
4. Agua DEPC
5. ARNase OUT TM (Invitrogen)
6. Iniciadores Forward y Reverse (Invitrogen):

5.1.4 Extracción de proteínas y Western Blot

1. Raspador de goma (Corning)
2. Placas de 12 y 6 pozos transparentes de fondo plano (Costar)
3. Cámara de electroforesis vertical y para electrotransferencia en condiciones húmedas (Bio-Rad).

5.1.5 Materiales biológicos

1. Línea celular HuH-7 Parental utilizada para la transfección con vector de expresión, pFK1, pNS5A y Core, la cual se obtuvo del cepario del laboratorio de Infectología Molecular, resguardado a -80°C.
2. La cepa de *E.coli* TOP10 utilizada para la transformación con los plásmidos pFK1, NS5A y Core se obtuvieron del cepario del laboratorio de Infectología Molecular, resguardado a -80°C.
3. Plásmidos pFK1, NS5A los cuales se obtuvieron del cepario del laboratorio de Infectología Molecular, resguardado a -20°C.
4. Vector de expresión pcDNA obtenido del cepario del laboratorio de Infectología Molecular, resguardado a -20°C.
5. Plásmido Core.

5.2 Equipos

5.2.1 Equipo de uso general

1. VórtexGenie 2
2. Thermomixer (Eppendorf)
3. Centrífuga refrigerada Biofuge primor (Heraeus)
4. Centrífuga Centrifuge 54150 (Eppendorf)



5. Centrífuga IECL30R (Thermoelectroncorporation)
6. Fuente de poder, Power Pac1000 (Bio-Rad)
7. Plancha con agitación (CIMAREC)
8. Agitador mecánico (LabGenius)

5.2.3 Cultivo celular

1. Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (Nuaire)
2. Incubadora de CO2 (Nuaire)
3. Microscopio óptico invertido olympus CKX41
4. Baño de agua Precision180
5. Agitador mecánico (LabGenius)

5.2.4 Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR)

1. Termociclador para PCR en tiempo real Real Time PCR system7500 (AppliedBiosystems)
2. Termociclador GeneAmp PCR system9700 (AppliedBiosystems)
3. Nanodrop 2000 (ThermoScientific)

5.2.5 Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western-Blot

1. Lector de ELISA Biotek ELX800
2. ChemiDoc™ (Bio-Rad)



CAPÍTULO 6: METODOS

6.1 Estrategia general

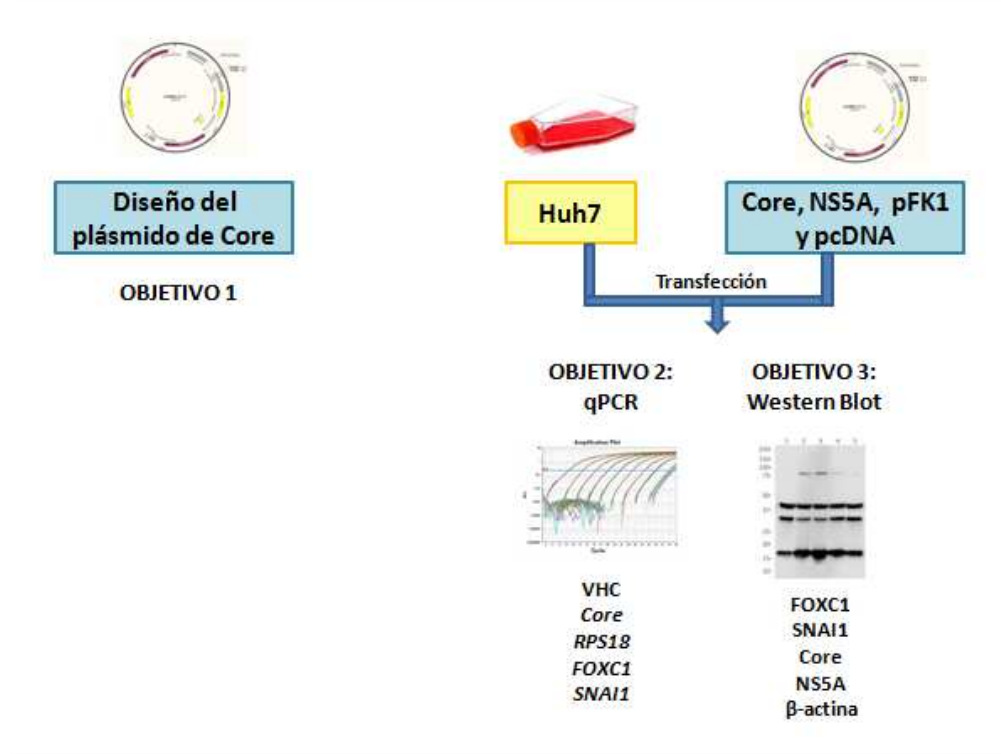


Figura 20: Estrategia general. Para el objetivo uno se realizó el diseño de un plásmido que actué como vector de expresión de la proteína Core del VHC. En el objetivo 2 se realizó la transfección de los plásmidos Core, NS5A y pFK1 en células Huh7 y se comparó la expresión a nivel transcripcional de FOXC1 y SNAI1 usando como control células Huh7 transfectadas con el plásmido pcDNA (plásmido vacío). En el objetivo 3 se realizó la misma metodología pero esta vez se realizó una comparación a nivel traduccional.



6.2 Métodos

6.2.1 Diseño del plásmido de Core

Se seleccionó la secuencia de la proteína Core del VHC genotipo 1b (GenBank: AJ238799.1) a esta secuencia le fue añadido al principio el sitio de restricción para HindIII seguido por la secuencia de Kozak y al final un codón de parada seguido del sitio de restricción para EcoRI.

Se emplearon los servicios de GenScript para sintetizar la secuencia e insertarla en el vector de expresión pcDNA 3.1 (+) en el sitio múltiple de clonación (SMC) entre los sitios de restricción para HindIII y EcoRI.

Se caracterizó el plásmido y se comprobó la expresión a nivel transcripcional y traduccional de la proteína Core del VHC empleando qPCR y Western Blot.

6.2.2 Preparación y transformación de células *E. coli* TOP 10 Calciocompetentes

6.2.2.1 Preparación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl₂

1. Se tomaron 100 µl de bacterias *E. coli* TOP 10 congeladas y colocarlas en 100 mL de medio LB.
2. Se incubaron a 37°C hasta en baño de agua con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm.
3. Se dividieron los 100 mL de medio + bacterias en un par de tubos falcon de 50 mL.
4. Fueron centrifugados a 5000 rpm durante 3min a 4 °C.
5. Se decantó el líquido y se resuspendió la pastilla en 1 mL de CaCl₂ 0.1 M frío y posteriormente juntar ambas alícuotas.
6. Se completó a 30 mL con CaCl₂ 0.1 M frío.
7. Se incubó 30 min en hielo.
8. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5min a 4 °C.
9. Se decantó el líquido y resuspendió la pastilla en 2 mL CaCl₂ 0.1 M frío.

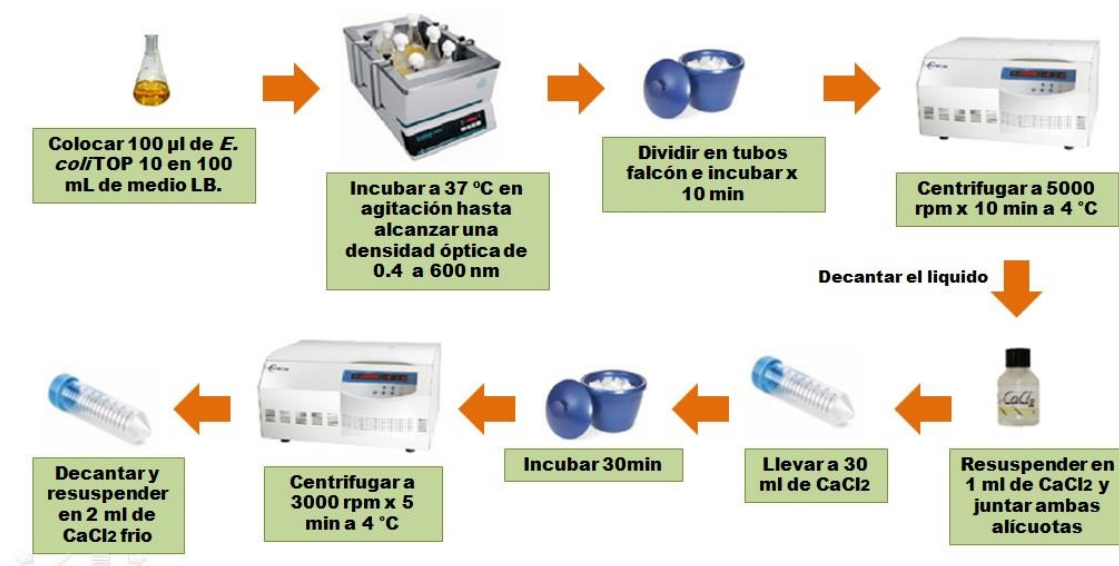


Figura 21: Esquema de la preparación de células calciocompetentes. En la figura se representa gráficamente el proceso que se llevó a cabo para la preparación de células calciocompetentes.

6.2.2.2 Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl₂ (Cohen, Chang, & Hsu, 1972)

1. Se mezcló una cantidad determinada del plásmido a utilizar con 100 µL de bacterias Ca-Competentes. Hacer esto con sumo cuidado ya que las membranas de las bacterias se encuentran muy sensibilizadas.
2. Fue Incubado en hielo 30 min.
3. Terminado el tiempo de incubación en hielo, Se colocó el tubo a 42 °C en el termomixer por 90 seg y sin agitación (shock térmico).
4. Se regresó el tubo a hielo por 10 min.
5. Fueron adicionados 100 µL de medio LB y se incubó a 37 °C en termomixer, sin agitación por 1 h.
6. Se dio spin a los tubos por 7 seg/13,000 rpm.
7. Fueron retirados 120 µl del sobrenadante.
8. Se resuspendió la pastilla en el medio restante.
9. Se sembró todo el contenido del tubo en una placa con mediosólido Lb/amp 50 µg/ml.
10. Se incubó la placa entre 12 y 16 h.



11. Fue sellada la caja con papel parafilm y se almacenó a 4 °C hasta seleccionar las colonias.

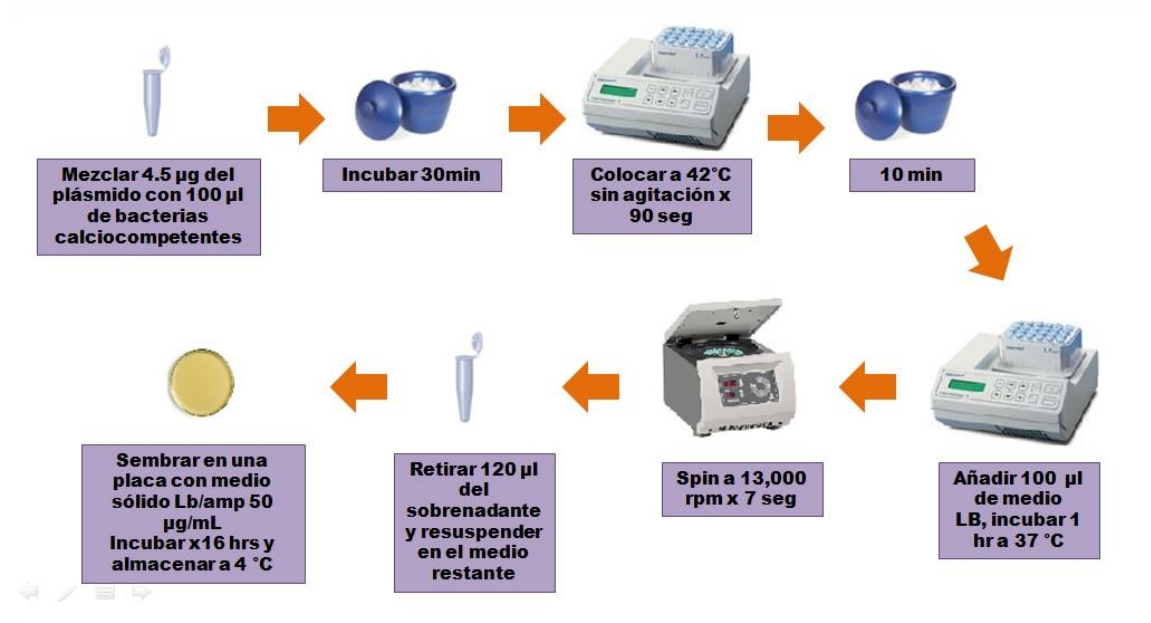


Figura 22: Esquema de la preparación de la transformación de células calciocompetentes. En la figura se representa gráficamente el proceso que se llevó a cabo para la transformación de las células calciocompetentes.

6.2.3 Preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS: Midiprep

El ADN plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001).

Preparación de células

1. Fueron inoculados 10 mL de medio LB con antibiótico, con una colonia transformada de bacteria. Se Incubó toda la noche a 37°C con agitación vigorosa.
2. Se transfirió el cultivo a un tubo de 15 mL y se recuperaron las bacterias por centrifugación a 2000 g, por 10 min a 4 °C.
3. Fue removido el medio por aspiración, permitiendo que el pellet de bacteria se secara lo más posible.



6.2.4 Lisis celular

1. Se resuspendió el pellet en 200 μ l de Solución de Lisis Alcalina I fría con vortex vigoroso, se transfirió la solución a un tubo de 2 mL.
2. Fueron añadidos 400 μ l de Solución de Lisis Alcalina II recientemente preparada a cada suspensión de bacterias. Se cerró el tubo herméticamente y mezcló el contenido 5 veces por inversión rápida.
3. Se añadieron 300 μ l de Solución de Lisis Alcalina III fría. Se cerró el tubo y mezcló por inversión varias veces. El tubo fue almacenado en hielo de 3-5 min.
4. Se centrifugó el lisado bacteriano a velocidad máxima por 5 min a 4°C en una microcentrífuga. Se transfirieron 600 μ l del sobrenadante a un tubo limpio.
5. Se añadió igual volumen de fenol: cloroformo. Se mezcló la fase orgánica con la acuosa por vortex y luego se centrifugó la emulsión a velocidad máxima por 2 min a 4°C en una microcentrífuga. Se transfirió la fase acuosa que se encuentra por encima de la capa formada a un tubo limpio.

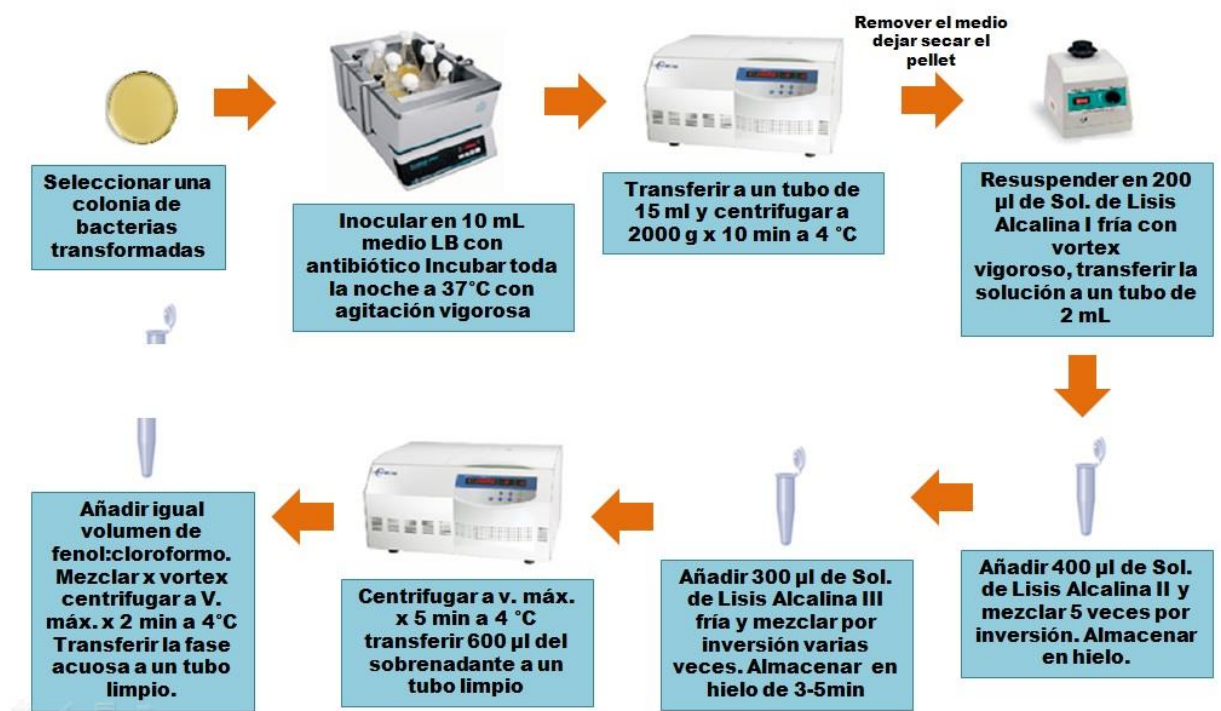


Figura 23: Esquema de la preparación de células para la lisis alcalina. En la figura se representa gráficamente el proceso que se llevó a cabo para el lisado de las células.



6.2.5 Recuperación del plásmido

1. Fueron precipitados los ácidos nucleicos del sobrenadante por adición de 600 μ L de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló la solución en vortex y se incubó 2 min a temperatura ambiente.
2. Se recuperó el ácido nucleico precipitado por centrifugación a velocidad máxima por 5 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga.
3. Se removió el sobrenadante por aspiración con micropipeta. Se colocó el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel para permitir que los fluidos restantes se drenen.
4. Fue añadido 1 mL de Etanol al 70% al pellet y se recuperó el ADN por centrifugación a máxima velocidad por 2 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga.
5. Nuevamente se removió el sobrenadante por aspiración con micropipeta.
6. Fue removido cualquier residuo de etanol de las paredes del tubo. Se almacenó el tubo abierto a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporó y no hubo restos de ningún fluido visible en el tubo.
7. Se disolvieron los ácidos nucleicos en 100 μ l de TE 1X pH 8 que contiene 20 μ g/mL RNasa libre de ADNasa. Se mezcló en vortex unos segundos. Fue almacenada la solución a -20°C .

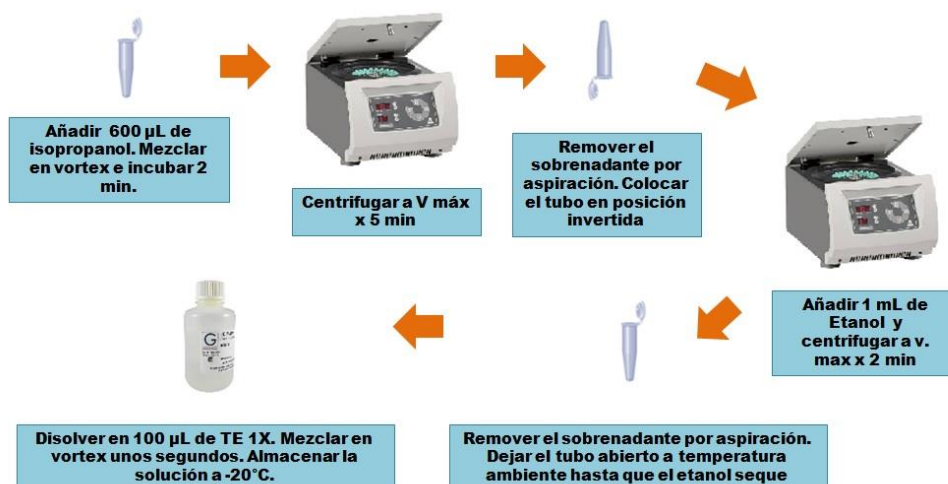
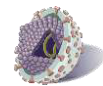


Figura 24: Esquema de la recuperación de ADN plasmídico. En la figura se representa gráficamente el proceso que se llevó a cabo extracción de ADN plasmídico.



6.2.5.1 Caracterización de plásmido Core

Para confirmar la extracción del plásmido por el método de lisis alcalina con SDS, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar al plásmido en su forma laxa y superenrollado.

6.2.5.2 Caracterización del plásmido pFK1, NS5A y Core

Para confirmar la identidad de la secuencia clonada en los vectores de expresión pFK1, NS5A y Core se llevó a cabo la caracterización con el corte con enzimas de restricción (Hind III y EcoRI), los patrones obtenidos fueron comparados con los esperados por los análisis in silico por predicción con base en sus secuencias.

6.2.5.3 Purificación del ADN plasmídico a partir de gel de agarosa al 1%.

El producto de la digestión fue corrido en gel de agarosa al 1% a fin de separar los fragmentos de interés de los contaminantes residuales de la digestión.

6.2.6 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa PrimerQuestTool de IDT, se seleccionaron un par de primer para la secuencias de los genes FOXC1, SNAI1 y para la región UTR 5' del VHC. Se utilizó el programa OligoAnalyzer de IDT para descartar posibles inespecificidades.

6.2.7 Cultivo de células Hela

1. Partiendo de células en una botella de 25 cm² a un 90% de confluencia, se retiró el medio por aspiración.
2. Se realizó un lavado con 2 mL de PBS 1 X (el volumen a utilizar depende del tamaño de botella que se emplea, ver anexos).
3. Se desechó el PBS por aspiración, y se adicionó 1 mL de tripsina 1x e incubó durante 10 min a 37°C, 5% de CO₂.
4. Se agregó 1 mL de medio DMEM advanced con 2% SBF para inactivar la tripsina y pasar el contenido de la botella a un tubo cónico de 15 mL.



5. Fue centrifugado a 1,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Se retiró el medio y resuspendió con puntilla azul las células en 1 mL de medio nuevo (el volumen dependerá del tamaño del botón celular obtenido, ver anexos).
7. Se colocó el volumen de células en cajas de 75 cm² de acuerdo a la cantidad que se desee expandir (para su posterior uso de producción de virus vaccinia (4 cajas de 75 cm²).

6.2.8 Ensayo de actividad biológica de virus vaccinia

El ensayo de actividad biológica del virus vaccinia sobre las células HuH-7 se describe en los anexos.

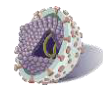
6.2.9 Cultivo de células HuH-7

6.2.9.1 Stock de células HuH-7 Parental

- A. Fue descongelado a temperatura ambiente un vial con células HuH-7 Parental almacenadas a -80°C. (Ver anexos)
- B. Se adicionó todo el contenido del vial (1 mL) de células HuH-7 Parental a una botella de 25 cm² con 4 mL de medio DMEM advanced suplementado con 2% SBF, incubar a 37°C y 5% CO₂.
- C. Cuando el cultivo celular alcanzó un 90% de confluencia, se hizo un subcultivo a una botella de 75 cm².
- D. Se recuperaron todas las células de la botella de 75 cm² utilizando tripsina 1x (para despegarlas de la base de la botella de cultivo). Se realizar el conteo de células con azul tripano en cámara de Neubauer (ver anexos).

6.2.9.2 Subcultivo de células HuH-7 Parental

1. Partiendo de células en una botella de 25 cm² a un 90% de confluencia, se retiró el medio por aspiración.
2. Fue Realizado un lavado con 2 mL de PBS 1 X (el volumen a utilizar depende del tamaño de botella que se emplea, ver anexos).



3. Se desechó el PBS por aspiración, y adición de 1 mL de tripsina 1x e incubó durante 10 min a 37°C, 5% de CO₂.
4. Fue agregado 1 mL de medio DMEM advanced con 2% SBF para inactivar la tripsina y pasar el contenido de la botella a un tubo cónico de 15 mL.
5. Se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Fue retirado el medio y se resuspendieron con puntilla azul las células en 1 mL de medio nuevo (el volumen dependerá del tamaño del botón celular obtenido, ver anexos).

Conteo celular:

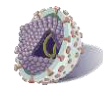
7. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL, se hizo una dilución 1:8 de células en medio de cultivo. Por lo tanto, adicionar 60 µl de medio más 10 µl de células.
8. Además, se agregaron 10 µl de azul de tripano al 0.4%, se mezcló perfectamente y se colocaron 10 µl en cámara de Neubauer para contar.
9. Se contaron los cuatro cuadrantes de las esquinas. Se sacó un promedio, y multiplicaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de Células/mL} = \text{Promedio de células} \times 8 \text{ (factor de dilución)} \times 10,000$$

10. Ya con el número de células determinado se inocularon las necesarias de acuerdo al experimento a realizar.

6.2.10 Cultivo de células HuH7 Replicón

- A. Se descongelaron a temperatura ambiente un vial con células HuH-7 Replicón almacenadas a -80°C. (ver anexos)
- B. Se colocó todo el contenido del vial (1 mL) de células HuH-7 Parental a una botella de 25 cm² con 4 mL de medio DMEM advanced suplementado con 2% SBF, incubar a 37°C y 5% CO₂.
- C. Cuando el cultivo celular alcanzó un 90% de confluencia, se realizó un subcultivo a una botella de 75 cm².
- D. Se recuperaron todas las células de la botella de 75 cm² utilizando tripsina 1x (para despegarlas de la base de la botella de cultivo). Se realizó el conteo de células con azul tripano en cámara de Neubauer (ver anexos).



6.2.10.1 Subcultivo de células HuH7 Replicón

1. Partiendo de células en una botella de 25 cm² a un 90% de confluencia, se retiró el medio por aspiración.
2. Se realizó un lavado con 2 mL de PBS 1 X (el volumen a utilizar depende del tamaño de botella que se emplea, ver anexos).
3. Se desechó el PBS por aspiración, y se adicionó 1 mL de tripsina 1x e incubó durante 10 min a 37°C, 5% de CO₂.
4. Se agregó 1 mL de medio DMEM advanced con 2% SBF para inactivar la tripsina y pasar el contenido de la botella a un tubo cónico de 15 mL.
5. Se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Fue retirado el medio y se resuspendió con puntilla azul las células en 1 mL de medio nuevo (el volumen dependerá del tamaño del botón celular obtenido, ver anexos).

Conteo celular:

7. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL, se hizo una dilución 1:8 de células en medio de cultivo. Por lo tanto, se adicionó 60 µl de medio más 10 µl de células.
8. Se agregaron 10 µl de azul de tripano al 0.4%, se mezcló perfectamente y colocaron 10 µl en cámara de Neubauer para contar.
9. Se contaron los cuatro cuadrantes de las esquinas. Se promedió, y multiplicó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de Células/mL} = \text{Promedio de células} \times 8 \text{ (factor de dilución)} \times 10,000$$

10. Ya con el número de células determinado, se inocularon las necesarias de acuerdo al experimento a realizar

6.2.11 Ensayo de transfección transitoria

Día 1

1. Un día antes de la transfección se sembraron 125,000 células (HuH-7) en placas de 12 pozos usando 1 mL de medio ADMEM sin suero y sin antibiótico (Se duplicaron las cantidades al usar placas de 6 pozos).

Día 2



2. Una vez que las células se encuentren en una confluencia entre 90%, entonces, se retiraron 500 μl de medio de cultivo (En caso de placas de 6 pozos las cantidades se duplican).
3. Posteriormente, cada pozo de la placa fue infectado con 0.1 μl del stock de virus vaccinia recombinante. Es importante realizar previamente el ensayo de actividad biológica para definir el volumen necesario para infectar las células (ver anexos) (en el caso de placas de 6 pozos las cantidades se duplican).
4. En seguida las células fueron incubadas durante 1 hora. Mientras transcurría el tiempo de la infección se prepararon las mezclas de transfección como se describe en la figura 25.

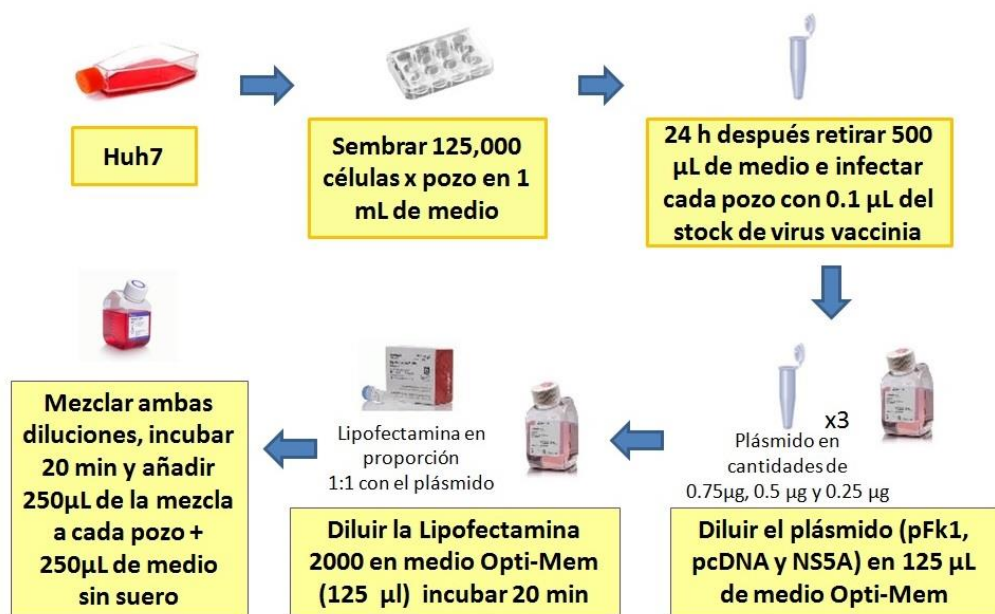


Figura 25: Esquema de la transfección transitoria.

6.2.12 Extracción de ARN total a partir de células en monocapa por el método de TRIzol®

1. Fue removido mediante aspiración el medio de cultivo de cada pozo sin hacer lavado con PBS.
2. Fase de Homogenización:
 - Se adicionaron 650 μl de TRIzol (1 mL en placas de 6 pozos) a cada pozo de la caja de 200 pozos, para lisar las células.
3. Fase de separación:



- Se incubaron durante 5 min a TA y después transferir la mezcla de TRIzol a un tubo Eppendorf de 2 mL.
 - Fueron adicionados 130 μ l de cloroformo frío (200 μ l en placas de 6 pozos), en éste caso 120 μ l en total, ya que se realizó por triplicado. Mezclar por inversión durante 15 seg.
 - Se incubó el tubo en hielo de 2 a 3 min.
 - Fue centrifugado a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C.
4. Fase de precipitación:
- Se recuperó sólo la fase acuosa y se adicionaron 325 μ l de isopropanol (500 μ l en placas de 6 pozos).
 - Se incubó toda la noche a -80°C.
 - Fue centrifugado a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Fase de lavado:
- Fue removido el sobrenadante y se lavó la pastilla con 650 μ l de etanol (500 μ l en placas de 6 pozos) al 70% y se mezcló con vórtex.
 - Fue centrifugado a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C.
6. Fase de resuspensión:
- Se retiró el etanol sin tocar la pastilla. Se dio un spin a TA.
 - Se resuspendió en 20 μ l de agua DEPC.

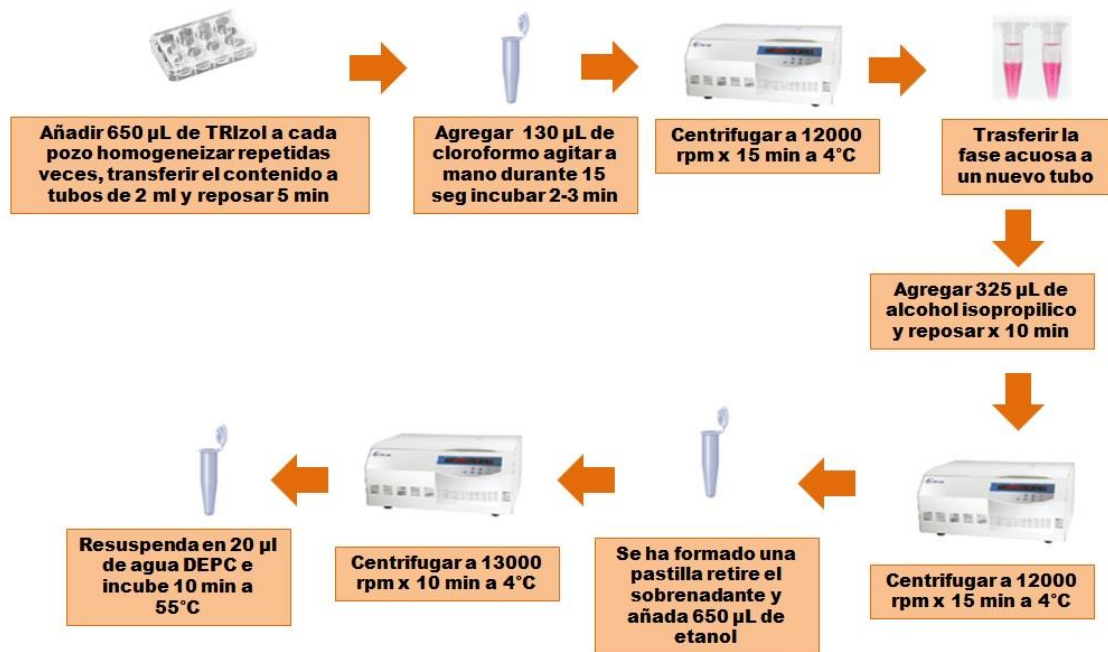


Figura 26: Esquema de la extracción de ARN. En la figura se representa gráficamente el proceso que se llevó a cabo para la extracción de ARN.

6.2.13 Retrotranscripción mediante M-MLV (RT-PCR M-MLV)

1. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL se mezclaron los siguientes reactivos (1x):

Reactivo	Volumen
Random Primers	1 µl
ARN	400ng
Agua DEPC	cbp 11.5 µl
Volumen Final	11.5 µl

Tabla 3: Mezcla 1 para retrotranscripción de ARN con RT-MMLV.

2. Se incubó 10 min a 72°C en termociclador.
3. Se pausó el termociclador, enfriar tubos a 4°C en hielo 3 minutos (No exceder tiempo)
4. Fueron agregados 8.5 µl de la mezcla 2 (1X)



Reactivo	Volumen
Buffer 5x	4 μ l
DTT	2 μ l
RNasaout	0.5 μ l
dNTPs	1 μ l
MMLV	1 μ l
Volumen Final	20 μ l

Tabla 4: Mezcla 2 para retrotranscripción de ARN con RT-MMLV.

5. Se programó termociclador con las siguientes condiciones:

	Tiempo	Temperatura
1	10 min	25 °C
2	1 h	37 °C
3	5 min	94 °C
4	10 min	4 °C

Tabla 5: Condiciones de retrotranscripción de ARN con RT-MMLV.

6. Después de que se obtiene el cDNA se llevó a cabo la cuantificación del mismo, así como diluciones de 25 ng/ μ l en agua DEPC y se cuantificaron dichas diluciones para comprobar su concentración.

6.2.14 Cuantificación relativa del ARN viral por RT-PCR en Tiempo Real

6.2.14.1 Genes pFK1(proteínas no estructurales)y NS5A

Para la cuantificación relativa de los niveles de ARN se empleó Sybr Green

Ambos plásmidos contienen la región 5' del VHC por lo que se diseñaron oligonucleótidos específicos para esta región.

1. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL se agregaron los siguientes reactivos en éste orden:



Reactivo	Volumen
SybrGreenERqPCR SuperMix 2 X	10 μ l
Forward 5 μ M	1.6 μ l
Reverse 5 μ M	1.6 μ l
Agua DEPC estéril	4.8 μ l
cDNA	100 ng (2 μ l)
Vol. Final	20 μ l

Tabla 6: Reactivos para qPCR (Células transfectadas con pFK1).

Reactivo	Volumen
Sybr GreenERqPCR SuperMix 2 X	10 μ l
Forward 5 μ M	1.6 μ l
Reverse 5 μ M	1.6 μ l
Agua DEPC estéril	4.8 μ l
cDNA	100 ng (2 μ l)
Vol. Final	20 μ l

Tabla 7: Reactivos para qPCR (Células transfectadas con NS5A).

- Después en tubos para qPCR (0.2 mL) se adicionaron a la mezcla anterior el volumen de cDNA para tener 100ng en cada tubo. El blanco fue un tubo que en lugar de cDNA se le adiciona agua milliQ. El volumen final será de 20 μ l por tubo.
- Se programó el termociclador (indicar que se usa Sybr Green) con las siguientes condiciones:

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
1	2 min	50 °C	
2	10 min	95 °C	
3	15 seg	95 °C	
4	1 min	60 °C	40

Tabla 8: Condiciones generales de amplificación para qPCR.

6.2.14.2 Gen de la proteína Core del VHC

Para la cuantificación relativa de los niveles de ARN se empleó Sybr Green.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen de la proteína Core.



1. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL se agregaron los siguientes reactivos en éste orden:

Reactivo	Volumen
Sybr GreenER qPCR SuperMix 2 X	10 µl
Forward 5 µM	0.4 µl
Reverse 5 µM	0.4 µl
Agua DEPC estéril	6.2 µl
cDNA	100 ng (2µl)
DMSO	1 µl
Vol. Final	20 µl

Tabla 9: Reactivos para qPCR (gen de la proteína Core del VHC).

2. Después en tubos para qPCR (0.2 mL) se adicionó el volumen de cDNA para tener 100ng en cada tubo. El blanco fue un tubo que en lugar de cDNA se le adicionó Agua milliQ. El volumen final fue de 20 µl por tubo.
3. Se programó termociclador con las mismas condiciones antes mencionadas para qPCR de VHC-ARN. Se indicó en el programa que se usa Sybr Green.

6.2.14.3 Gen endógeno RPS18

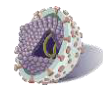
Para la cuantificación relativa de los niveles de ARN se empleó Sybr Green

Se emplearon oligonucleótidos específicos para el gen RPS18.

1. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL se agregaron los siguientes reactivos en éste orden:

Reactivo	Volumen
Sybr GreenERqPCR SuperMix 2 X	10 µl
Forward 5 µM	1 µl
Reverse 5 µM	1 µl
Agua DEPC estéril	6 µl
cDNA	100 ng (2µl)
Vol. Final	20 µl

Tabla 10: Reactivos para qPCR (gen endógeno RPS18).



- Después en tubos para qPCR (0.2 mL) se adicionó el volumen de cDNA para tener 100ng en cada tubo. El blanco será un tubo que en lugar de cDNA se le adiciona Agua milliQ. El volumen final será de 20 μ l por tubo.
- Se programó termociclador con las mismas condiciones antes mencionadas para qPCR de VHC-ARN. Se indicó en el programa que se usa Sybr Green.

6.2.14.4 Gen FOXC1

Para la cuantificación relativa de los niveles de ARN se empleó Sybr Green

Se diseñaron primers específicos para el gen FOXC1.

- En un tubo Eppendorf de 0.6 mL se agregaron los siguientes reactivos en éste orden:

Reactivo	Volumen
Sybr GreenER qPCR SuperMix 2 X	10 μ l
Forward 5 μ M	0.4 μ l
Reverse 5 μ M	0.4 μ l
Agua DEPC estéril	7.2 μ l
cDNA	100 ng (2 μ l)
Vol. Final	20 μ l

Tabla 11: Reactivos para qPCR (gen FOXC1).

- Después en tubos para qPCR (0.2 mL) se adicionó el volumen de cDNA para tener 100ng en cada tubo. El blanco será un tubo que en lugar de cDNA se le adiciona Agua milliQ. El volumen final será de 20 μ l por tubo.
- Se programó termociclador con las mismas condiciones antes mencionadas para qPCR de VHC-ARN. Se indicó en el programa que se usa Sybr Green.



6.2.14.5 Gen SNAI1

Para la cuantificación relativa de los niveles de ARN se empleó Sybr Green

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen SNAI1.

1. En un tubo Eppendorf de 0.6 mL se agregaron los siguientes reactivos en éste orden:

Reactivo	Volumen
Sybr GreenER qPCR SuperMix 2 X	10 µl
Forward 5 µM	1 µl
Reverse 5 µM	1 µl
Agua DEPC estéril	6 µl
cDNA	100 ng (2µl)
Vol. Final	20 µl

Tabla 12: Reactivos para qPCR (gen SNAI1).

2. Después en tubos para qPCR (0.2 mL) se adicionó el volumen de cDNA para tener 100ng en cada tubo. El blanco fue un tubo que en lugar de cDNA se le adicionó Agua milliQ. El volumen final será de 20 µl por tubo.
3. Se programó termociclador con las mismas condiciones antes mencionadas para qPCR de VHC-ARN. Se indicó en el programa que se usó Sybr Green.

6.2.15 Extracción y cuantificación de proteínas totales

6.2.15.1 Extracción de proteínas totales

De una placa de 6 pozos, posterior a 36 h de transfección:

Fue retirado todo el medio con micropipeta y se colocó la placa sobre hielo.

1. Se añadieron 30 µl de la solución de raspado (PBS 1X/EDTA 1mM)
2. Con un raspador de goma (scraper) se realizó el raspado de arriba hacia abajo aplicando presión sólo en una dirección (al regresar el raspador, no raspar de abajo hacia arriba), por último, se rasparon las orillas de la caja (rotar la caja de 3-4 veces 90°).



3. Se repitió el proceso girando 90°.
4. Con una Micropipeta se tomó la suspensión de células y colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
5. Se retiró el sobrenadante y fue pasado a un tubo nuevo (en el sobrenadante es donde se encuentran las proteínas).
6. Se almacenó a -20°C.

6.2.15.2 Cuantificación de proteínas por Método de Bradford

1. Fue elaborada una curva de calibración para cuantificación por método de Bradford (ver Anexos).
2. En una placa de 96 pozos se adicionaron 159 µl de agua destilada, 1 µl de la muestra de proteínas y 40 µl del reactivo de Bradford.
3. Se cuantificó la absorbancia a λ 600 nm.
4. A partir de la ecuación obtenida en la curva de calibración, se calculó la concentración de proteínas de cada tubo.
5. Si la absorbancia excede el valor de la dilución con mayor concentración, se recomienda hacer una dilución 1:4 en agua destilada y cuantificar nuevamente.

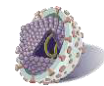
6.2.16 SDS-PAGE y electrotransferencia en condiciones húmedas

6.2.16.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

1. Fueron preparados mini geles de poliacrilamida al 12% de un grosor de 1mm (ver anexos).
2. Se depositaron en cada pozo del gel 50 µg de proteína con ¼ de volumen de buffer de carga 4X.
3. Se corrió el gel a 80 V alrededor de 3 h para la adecuada separación de las proteínas.

6.2.16.2 Electrotransferencia en condiciones húmedas

1. Fue recortada la membrana Hybond-P PVDF (AmerfBioscience) con dimensiones 6 cm ancho x 8 cm de largo.
2. Se sumergieron en Metanol al 100% por 10 seg.



3. La membrana fue lavada con agua milliQ 5 min y se equilibró la membrana con buffer de transferencia por 10 min. Se humedecieron 4 piezas de papel filtro y 2 esponjas en buffer de transferencia.
4. Fue retirado el gel de la cámara de electroforesis y se descartó el gel concentrador.
5. Se colocó sobre el gel una pieza de papel filtro, después la membrana activada sobre el gel y finalmente sobre ésta 2 piezas de papel filtro.
6. Se colocó en forma de sándwich de tal forma que la membrana quede de cara al lado claro (Ver anexos).
7. Se realizó la transferencia a 4°C durante 1 h a 100 V en agitación.
8. La membrana fue lavada con PBS 1x adicionado con 0.5% de Tritón X-100 durante 5 minutos.
9. Se tiñó la membrana con el colorante rojo de Ponceau por 1 min, y después se realizaron lavados con PBS 1X - 0.5% de Tritón X-100, para comprobar la transferencia de las proteínas a la membrana, así como visualizar si hubo formación de burbujas al momento de la transferencia.

6.2.17 Ensayo de Western blot

1. La membrana con las proteínas fue incubada en buffer de bloqueo a 4°C durante toda la noche en agitación.
2. Se lavó la membrana 3 veces con TTBS-1 durante 10 minutos por cada lavado, a temperatura ambiente en agitación.
3. La membrana fue incubada con el Anticuerpo primario (IgG de conejo anti-SNAI1, IgG de cabra anti-FOXC1, IgG de ratón anti-Core, anti-Flag y anti-Actina) durante 12 horas a 4°C en agitación.
4. Se lava la membrana 3 veces con TTBS durante 10 minutos por cada lavado a TA en agitación.
5. La membrana con el Anticuerpo secundario (Anti IgG de conejo conjugado con HRP o Anti IgG de ratón conjugado con HRP) fue incubada durante 1 hora a TA en agitación.
6. Se lavó la membrana 3 veces con TTBS-1 durante 10 minutos por cada lavado a TA en agitación.



7. Se procedió al ensayo de quimioluminiscencia (ECL: Enhanced Chemiluminescence):
- El excedente de TTBS-1 se dejó secar y se humedeció la membrana en la solución de luminol para revelar.
 - Fue mezclada durante 2 min con la solución de luminol y se reveló en el ChemiDoc TM (Bio-Rad).



CAPÍTULO 7: RESULTADOS

7.1 Diseño del plásmido de Core

Se seleccionó la secuencia de la proteína Core del VHC genotipo 1b (GenBank: AJ238799.1) a esta secuencia le fue añadido al principio el sitio de restricción para HindIII seguido por la secuencia de Kozak y al final un codón de parada seguido del sitio de restricción para EcoRI (Figura 27).

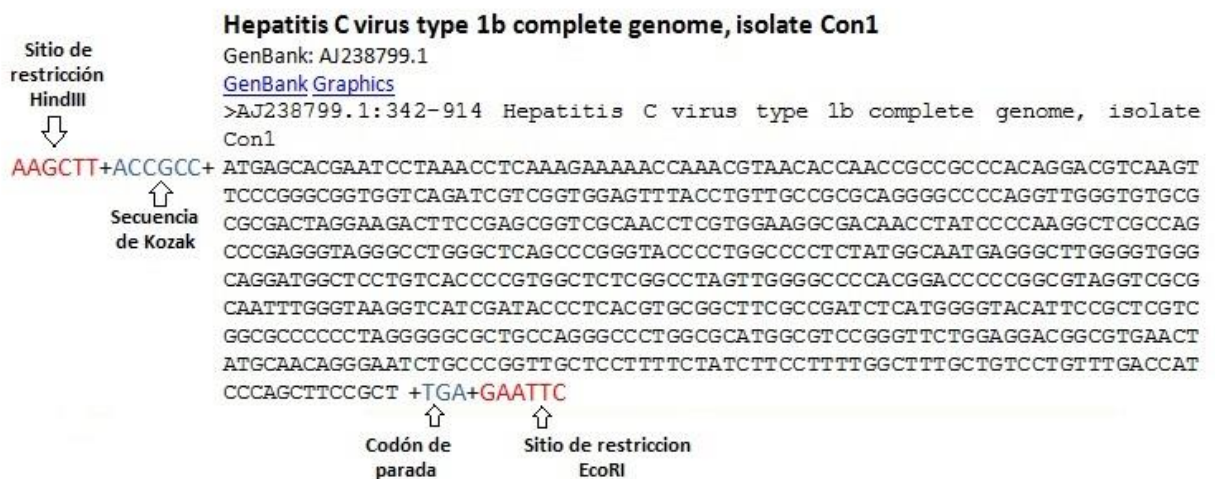


Figura 27: Diseño de plásmido de Core. Se seleccionó la secuencia de la proteína Core del VHC genotipo 1b (GenBank: AJ238799.1) a esta secuencia le fue añadido al principio el sitio de restricción para HindIII seguido por la secuencia de Kozak y al final un codón de parada seguido del sitio de restricción para EcoRI

Se emplearon los servicios de GenScript para sintetizar la secuencia e insertarla en el vector de expresión pcDNA 3.1 (+) en el sitio múltiple de clonación (MCS) entre los sitios de restricción para HindIII y EcoRI.

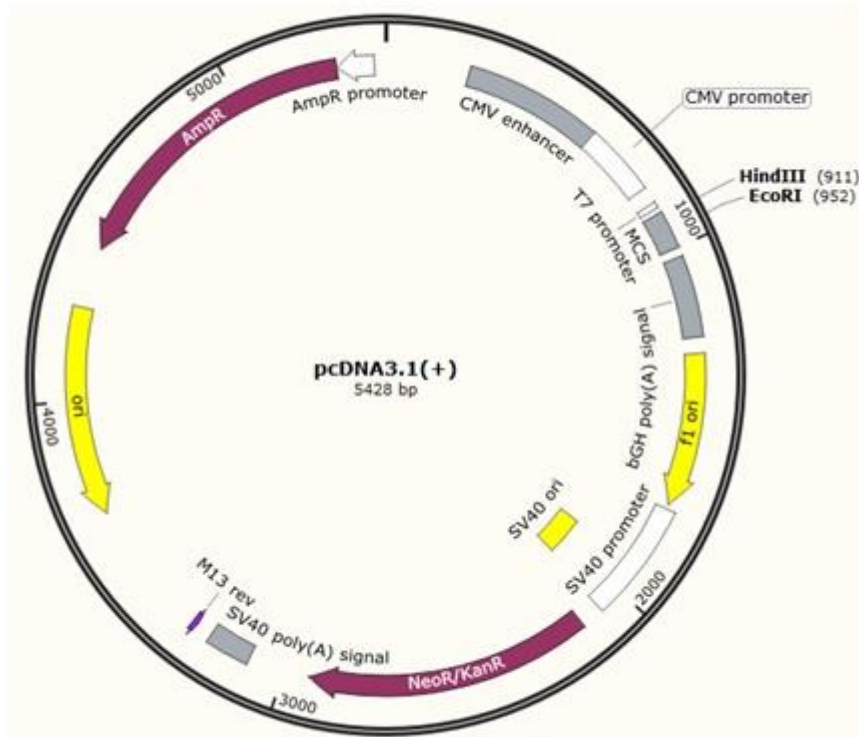


Figura 28: Vector de Expresión pcDNA3.1(+). La secuencia antes mencionada fue insertada en el MCS entre los sitios de restricción HindIII y EcoRI.

Una vez sintetizado el plásmido se realizó la caracterización empleando las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, buscando que dentro del vector se encontrara la secuencia insertada, para ello se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en la que se corrió el plásmido digerido y sin digerir. En la figura 29 se muestra este gel de agarosa, en el último carril se encuentra el marcador de peso molecular, en el primero se observa el plásmido sin digerir en su forma enrollada y superenrollada con un tamaño de 5,991 bp (pares de bases). En el segundo carril se muestra el plásmido digerido por 40 minutos con HindIII y EcoRI se observa el vector de expresión pcDNA 3.1(+) linealizado con un tamaño de 5.4kb y abajo la secuencia de Core con un tamaño de 591 pb.

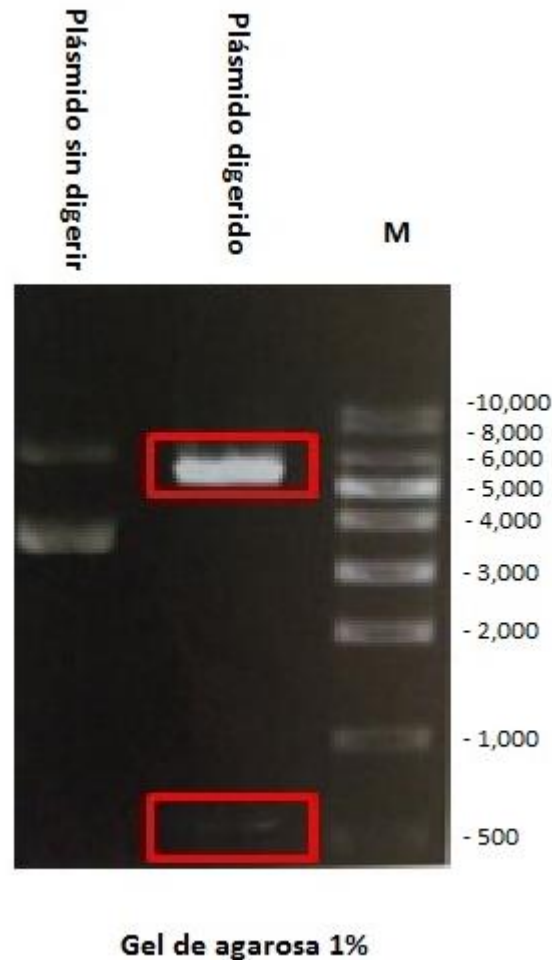


Figura 29: Caracterización del plásmido de Core del VHC. En el último carril se encuentra el marcador de peso molecular. En el primer carril se observa el plásmido sin digerir en su forma enrollada y superenrollada con un tamaño de 5,991bp. En el segundo carril se muestra el plásmido digerido por 40 minutos con HindIII y EcoRI se observa el vector de expresión pcDNA 3.1(+) linearizado con un tamaño de 5.4kb y abajo la secuencia de Core con un tamaño de 591 pb.

7.2 Midiprep

Se llevó a cabo la extracción plasmídica por el método de lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001) según se indica en metodología, sección 6.2. El producto obtenido se muestra en la Figura 29, en la cual se puede apreciar la integridad de los plásmidos obtenidos.



La figura 30 muestra el producto de la extracción realizada, donde a través del patrón de migración electroforética se confirmó el éxito de la extracción. Observándose las bandas correspondientes a pFK1 (11,000 kb), NS5A (6,500 kb) y pcDNA (5,800 kb), las tres bandas corresponden a las tres formas del plásmido, relajada, enrollada y superenrollada, en la tabla 13 se muestra la concentración de los plásmidos extraídos.

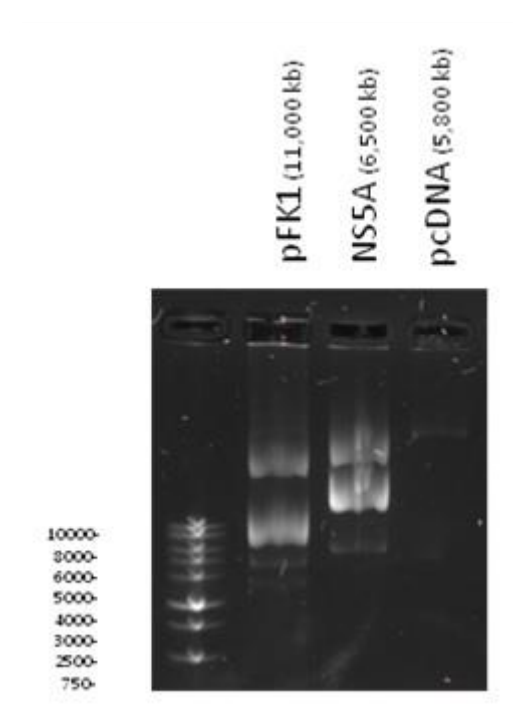


Figura 30: Extracción de los plásmidos pFK1 , pNS5A y pcDNA. Se aprecia la integridad de los plásmidos extraídos. Con flechas se señala el peso molecular de cada uno. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Las tres bandas en cada carril corresponden a las tres formas del plásmido, superenrollada, lineal y relajada.

Plásmido	Concentración
pcDNA	1245.5ng/ μ L
NS5A	1773.3ng/ μ L
pFK1	885.7 ng/ μ L

Tabla13: Concentración del plásmido extraído.



7.3 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante

Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos basándonos en secuencia del genoma completo de los genes SNAI1 y FOXC1 en cuanto a los genes virales se diseñaron oligonucleótidos (oligos) para la región UTR 5' del virus que se incluye en los plásmidos pFK1 y NS5A. En la tabla 3 se resumen los oligos diseñados, su secuencia y el código NCBI de la secuencia a partir de la que fue diseñado.

Oligos	Secuencia	NCBI Secuencia de referencia
SNAI1	FWD: CCACGAGGTGTGACTAACTATG REV: ACCAAACAGGAGGCTGAAATA	NM_005985.3
FOXC1	FWD: GCGGGTTGGAAAGGGATATT REV: CTCTCGCCTTCCTTCTTGTTATT	NM_001453.2
VHC	FWD: GCGTCTAGCCATGGCGTTA REV: GGTTCCGCAGACCACTATGG	NM_000386.4
Core	FWD: TCTATGGCAATGAGGGCTTG REV: GGTATCGATGACCTTACCCAAAT	AJ238799.1

Tabla 14: Oligonucleótidos diseñados que se usaron durante este proyecto.

En la figura 31 se muestra la eficiencia de los oligos diseñados donde se comprueba la amplificación logarítmica a diferentes concentraciones de cDNA lo que permite emplearlos para una cuantificación relativa por el método de Livak. Los oligos de Core no mostraron esta amplificación logarítmica.

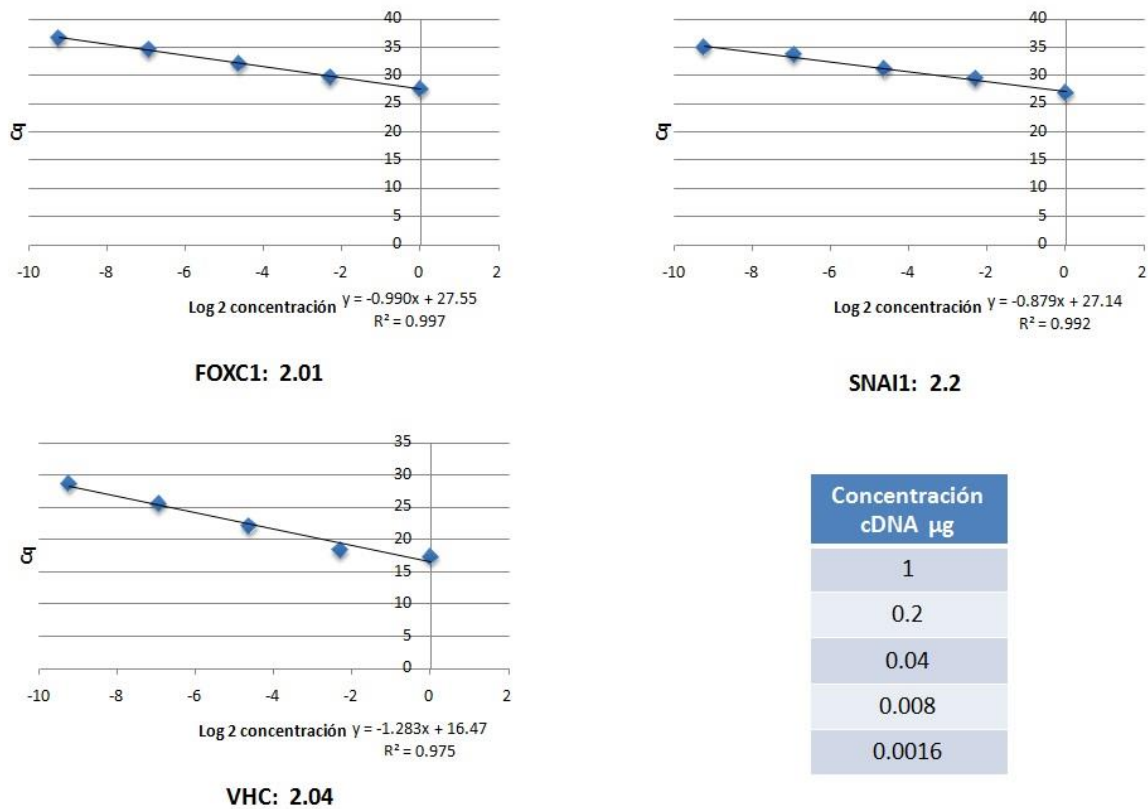


Figura 31: Eficiencia de oligonucleótidos. Se observan las eficiencias de los oligos diseñados. Se comprueba la amplificación logarítmica a diferentes concentraciones de cDNA lo que permite emplearlos para una cuantificación relativa por el método de Livak.

7.4 Comparación de la expresión de las líneas celulares Huh7 y Huh7-VHC Replicón

Primeramente se realizó la comparación de la línea celular Huh7 y la línea celular Huh7-VHC Replicón, esto se realizó como un estudio preliminar con el fin de analizar si existe alguna diferencia entre ambas líneas celulares en la expresión de los genes de estudio, SNAI1 y FOXC1, ya que la línea Replicón expresa constitutivamente las proteínas del VHC.

Para comenzar se realizó un análisis a nivel transcripcional por tal motivo se realizó una RT-qPCR del ARN extraído de ambas líneas celulares esto tras ser sembradas 24 horas antes en placas de 6 pozos.



En la Figura 32 se muestran los resultados de dicha RT-qPCR, Los datos fueron analizados por medio de una cuantificación relativa por el método de Livak usando como gen endógeno RPS18.

Como se observa en la figura 32 existe mayor expresión a nivel transcripcional de los genes de FOXC1 y SNAI1 en la línea celular que expresa constitutivamente las proteínas no estructurales del VHC (Huh7-VHC Replicón) a comparación de la línea celular Huh7, lo que nos da indicios de que las proteínas virales podrían inducir la expresión de estos genes.

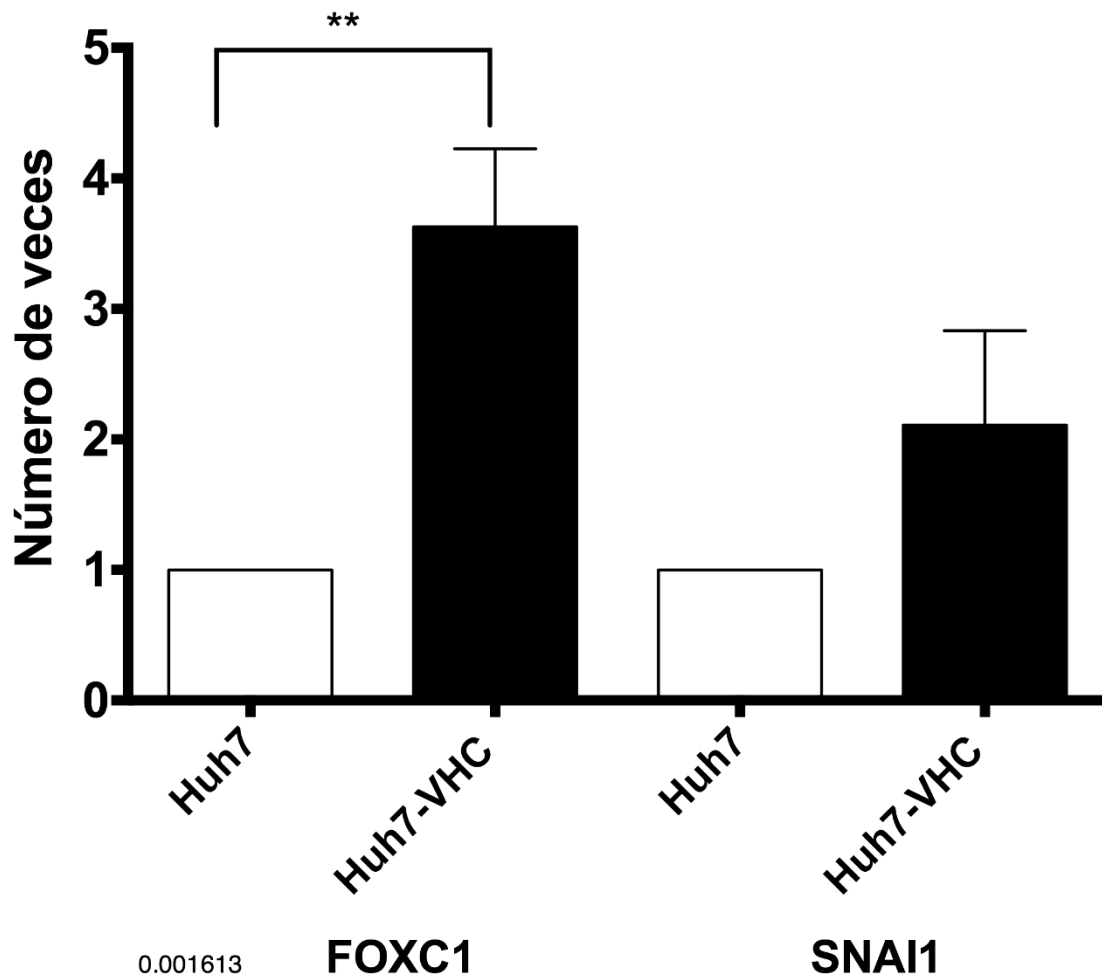
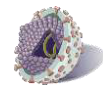


Figura 32: Comparación de la expresión a nivel transcripcional de FOXC1 y SNAI1 entre las líneas celulares Huh7 y Huh7-VHC Replicón. Se observa mayor expresión de FOXC1 y SNAI1 en la línea celular Huh7-VHC Replicón en comparación con la línea Huh7.



Posteriormente con el fin de comparar la expresión a nivel traduccional en ambas líneas celulares se realizó la extracción de proteínas de células sembradas 24 horas antes en placas de 6 pozos.

Esto fue seguido por la realización de un Western Blot empleando anticuerpos anti-SNAI1. Se realizó la densitometría utilizando el software ImajeJ normalizando con actina. Lo cual arrojo los resultados mostrados en la figura 33.

Contrario a lo esperado según los datos arrojados por el análisis a nivel transcripcional, encontramos una disminución en la expresión a nivel traduccional en la línea celular que expresa las proteínas virales (Huh7-VHC Replicón). Esto podría deberse a diferentes factores, por ejemplo se han encontrado diversas mutaciones adaptativas en el replicón subgenómico de esta línea celular, es importante aclarar que esta línea celular fue diseñada como modelo de estudio de la replicación viral (Blight, 2000) y para que esto fuera posible debió sufrir ciertas adaptaciones que permitieran mantener una replicación viral continua (Krieger, Lohmann, & Bartenschlager, 2001). Estas mutaciones, encontradas en los genes de NS5A y NS3, a pesar de favorecer la replicación continua en este modelo celular, se sabe que son incompatibles con la infección viral en modelos *in vivo* (Bukh et al., 2002). Por lo tanto este modelo de replicación podría no ser el ideal para el estudio de estos factores de transcripción relacionados con la patogénesis de la enfermedad ya que su mera expresión podría dar lugar a alteraciones que contravengan la viabilidad celular y por lo tanto ser incompatibles con el modelo de replicación continua.

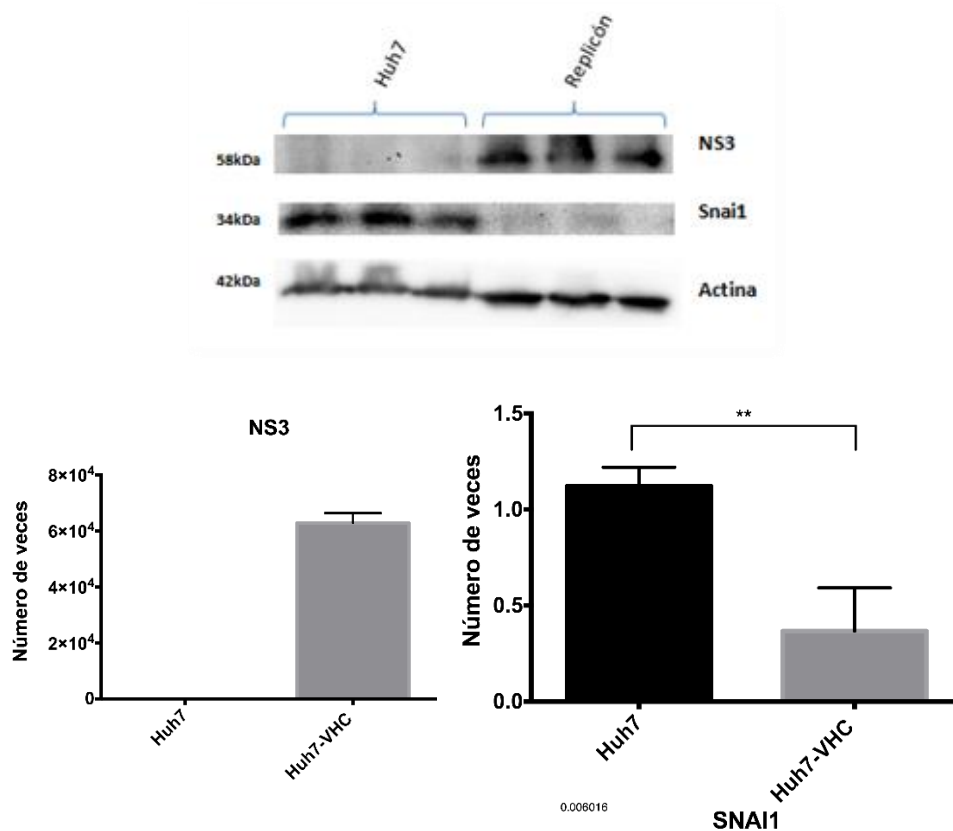


Figura 33: Comparación de la expresión a nivel traduccional de FOXC1 y SNAI1 entre las líneas celulares Huh7 y Huh7-VHC Replicón. El Western blot muestra una disminución de la expresión a nivel traduccional de Snai1 en la línea Replicón. En la parte inferior de observa el análisis densitométrico mediante ImageJ.

7.5 Ensayo de actividad biológica de virus vaccinia

Se llevó a cabo el ensayo de actividad biológica para definir el volumen necesario a utilizar de virus *Vaccinia* para infectar las células HuH-7 durante los ensayos de transfección. Se emplearon cantidades de 15 μ l, 10 μ l, 5 μ l, 3 μ l, 2 μ l, 1 μ l, 0.5 μ l, 0.25 μ l y 0.1 μ l del stock de virus vaccinia a tiempos de 24, 48 y 72 h.

En la figura 34 Se muestran los resultados de este ensayo. Se seleccionó la cantidad de 0.1 μ l ya que con esta cantidad se observa una mejor viabilidad a las 72 horas.

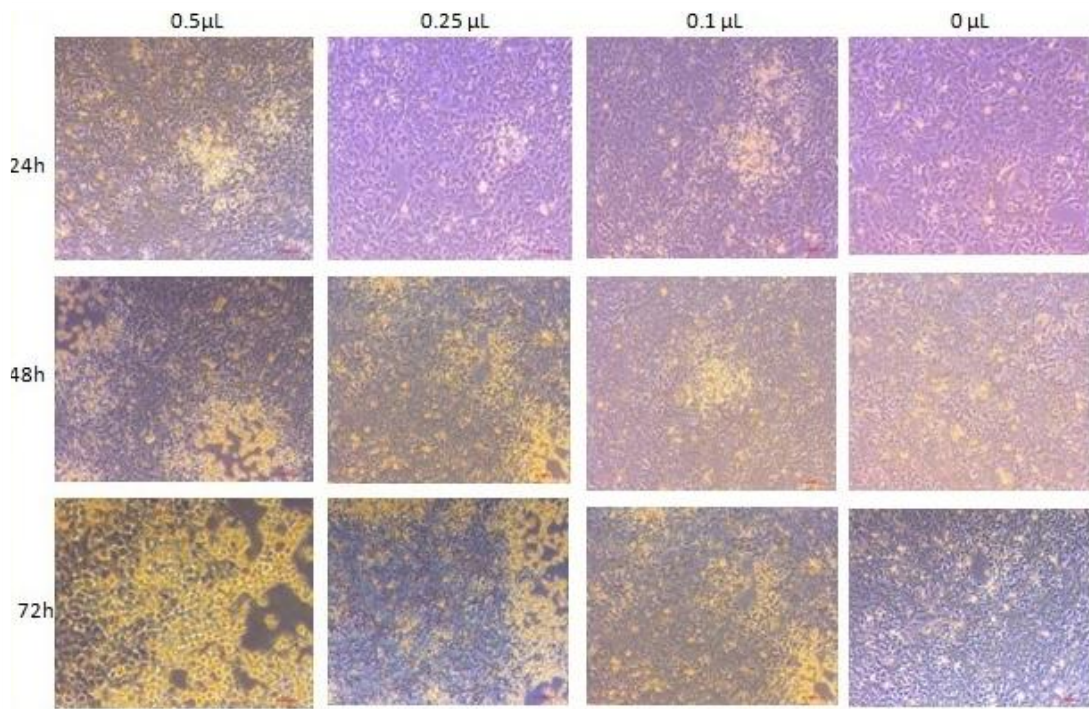


Figura 34: Prueba de viabilidad de células Huh7. Se muestra la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas tras la infección con cantidad de 0.5 μ L, 0.25 μ L y 0.1 μ L del stock de virus vaccinia para seleccionar la cantidad óptima a emplear durante la transfección. Se selecciona la cantidad de 0.1 por mostrar menor efecto citopático.

7.6 Transfección transitoria de células HuH-7 con pFK1.

7.6.1 Expresión a nivel transcripcional de los genes de las proteínas no estructurales del VHC.

Se realizó la transfección transitoria tal y como se describe en el apartado de métodos (6.2.11), posteriormente se extrajo el ARN total (6.2.12) de las células transfectadas a las 24, 48 y 72 horas. En la tabla 15 se muestran las concentraciones del ARN extraído de las células transfectadas con pFK1 y pcDNA.



Tiempo	pcDNA	pFK1
24h	104.6 ng/μl	352 ng/μl
	201.6 ng/μl	119 ng/μl
	142.8 ng/μl	171 ng/μl
48h	402.8 ng/μl	361.2 ng/μl
	313.2 ng/μl	583.9 ng/μl
	256.5 ng/μl	386.6 ng/μl
72h	455.7 ng/μl	475.5 ng/μl
	430 ng/μl	507.4 ng/μl
	444.7 ng/μl	452.5 ng/μl

Tabla 15: Concentración de ARN extraído de las células transfectadas con pFK1 y el control con pcDNA.

Una vez obtenido el ARN se realizó la retrotranscripción (6.2.13). En la tabla 16 se muestran las concentraciones de cDNA (DNA complementario) obtenido.

Tiempo	pcDNA	pFK1
24h	686.9 ng/μl	706.5 ng/μl
	702.2 ng/μl	833 ng/μl
	690.6 ng/μl	716.3 ng/μl
48h	938.1 ng/μl	1039.5 ng/μl
	975.4 ng/μl	1065.4 ng/μl
	1008.7 ng/μl	1051.1 ng/μl
72h	1013.5 ng/μl	1143.3 ng/μl
	981.3 ng/μl	1019.9 ng/μl
	974.4 ng/μl	1012.6 ng/μl

Tabla 16: Concentración de cDNA retrotranscrito a partir de ARN extraído de células transfectadas con pFK1 y pcDNA.



Una vez obtenido el cDNA se realizaron diluciones de éste con la finalidad de utilizar 2 μ l conteniendo 100 μ g de cDNA para el ensayo de PCR en tiempo real, en el caso de las dos cuantificaciones, VHC y RPS18.

Se realizó la PCR tiempo real de todos los tiempos obtenidos es importante mencionar que se probaron diferentes concentraciones del plásmido a la hora de transfectar las células (0.25, 0.5 y 0.75 μ g) a continuación solo se muestran los resultados de las células transfectadas con 0.75 μ g de plásmido debido a que a esta concentración se encontró una mayor expresión a nivel transcripcional de las proteínas virales.

En la figura 35 Se observa una disminución en la expresión a nivel transcripcional de los genes de las proteínas no estructurales del VHC, a través del tiempo, probablemente relacionado con la viabilidad celular.

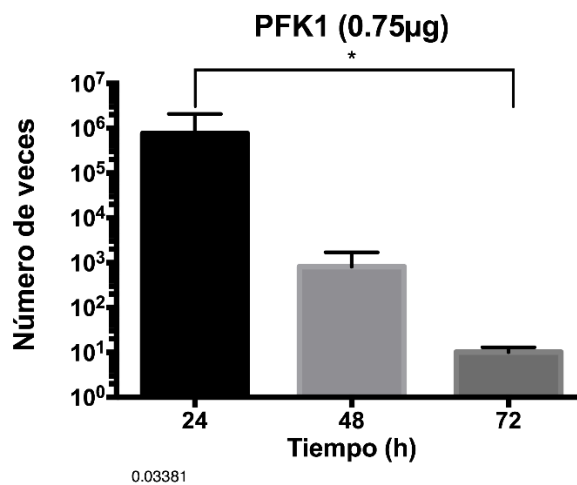


Figura 35: Expresión de los genes de las proteínas no estructurales del VHC 24, 48 y 72 horas posteriores a la transfección con el plásmido Pfk1.

7.6.2 Expresión a nivel transcripcional de los genes FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con pFK1.

Simultáneamente se realizó el estudio de la expresión a nivel transcripcional de FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con el plásmido pFK1. Se estudió la expresión a



través del tiempo y se comparó usando como control las células transfectadas con el plásmido vacío.

En la figura 36 se observa una mayor expresión a nivel transcripcional de SNAI1 en las células que expresan los genes de las proteínas no estructurales del VHC cuando las comparamos con el control. Inversamente se observa una menor expresión de FOXC1 en estas mismas células.

Por lo que se puede concluir que los genes de las proteínas no estructurales en conjunto inducen un incremento en la expresión de SNAI1 y una disminución en la expresión de FOXC1.

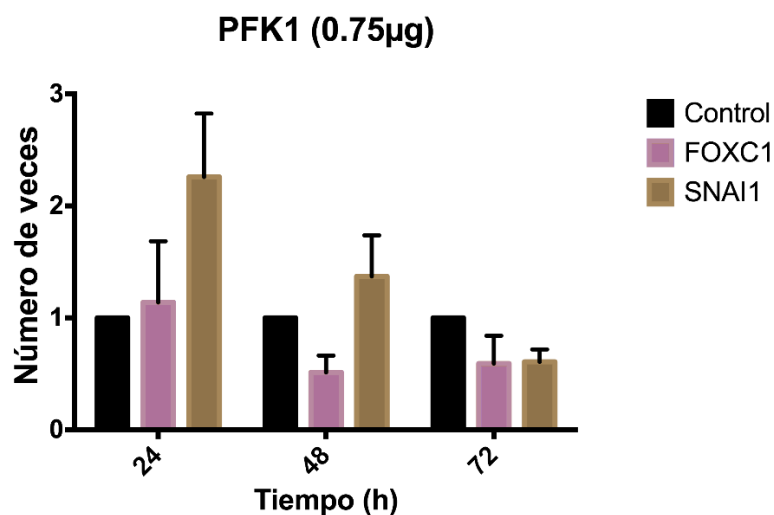


Figura 36: Expresión de FOXC1 y SNAI1 en células transfectadas con pFK1. Obsérvese una mayor expresión a nivel transcripcional de SNAI1 en las células que expresan los genes de las proteínas no estructurales del VHC, a pesar de observarse una tendencia con respecto a la expresión de pFK1 el incremento no es significativo. Inversamente se observa una menor expresión de FOXC1 en estas mismas células, esta disminución no fue estadísticamente significativa.



7.7 Transfección transitoria de células HuH-7 con NS5A.

7.7.1 Expresión a nivel transcripcional de NS5A.

Se realizó la transfección transitoria tal y como se describe en el apartado de métodos (6.2.11), posteriormente se extrajo el ARN total (6.2.12) de las células transfectadas a las 24, 48 y 72 horas. En la tabla 16 se muestran las concentraciones del ARN extraído de las células transfectadas con pFK1 y pcDNA.

Tiempo	pcDNA	NS5A
24h	98.3 ng/ μ l	298.2 ng/ μ l
	127.6 ng/ μ l	533.6 ng/ μ l
	131.2 ng/ μ l	540.8 ng/ μ l
48h	281.9 ng/ μ l	481.8 ng/ μ l
	640.4 ng/ μ l	694.2 ng/ μ l
	772.4 ng/ μ l	598 ng/ μ l
72h	305.2 ng/ μ l	167.2 ng/ μ l
	288.7 ng/ μ l	208.9 ng/ μ l
	478.9 ng/ μ l	346.4 ng/ μ l

Tabla 17: Concentración de ARN extraído de las células transfectadas con NS5A y el control con pcDNA.



Una vez obtenido el ARN se realizó la retrotranscripción (6.2.13). En la tabla 18 se muestran las concentraciones de cDNA (DNA complementario) obtenido.

Tiempo	pcDNA	NS5A
24h	629.6 ng/μl	610.3 ng/μl
	607.2 ng/μl	578.8 ng/μl
	605.5 ng/μl	587.6 ng/μl
48h	718.4 ng/μl	741.6 ng/μl
	713.9 ng/μl	773.7 ng/μl
	714.7 ng/μl	683.7 ng/μl
72h	629.6 ng/μl	610.3 ng/μl
	607.2 ng/μl	578.8 ng/μl
	605.5 ng/μl	587.6 ng/μl

Tabla 18: Concentración de cDNA retrotranscrito a partir de ARN extraído de células transfectadas con NS5A y pcDNA.

Una vez obtenido el cDNA se realizaron diluciones de éste con la finalidad de utilizar 2 μl conteniendo 100 μg de cDNA para el ensayo de PCR en tiempo real, en el caso de las dos cuantificaciones, VHC y RPS18.

Se realizó la PCR tiempo real de todos los tiempos obtenidos es importante mencionar que se probaron diferentes concentraciones del plásmido a la hora de transfectar las células (0.25, 0.5 y 0.75 μg) a continuación solo se muestran los resultados de las células transfectadas con 0.75μg de plásmido debido a que a esta concentración se encontró una mayor expresión a nivel transcripcional de las proteínas virales.

En la figura 37 se observa una disminución en la expresión a nivel transcripcional de los genes del gen NS5A del VHC, a través del tiempo, probablemente relacionado con la viabilidad celular.

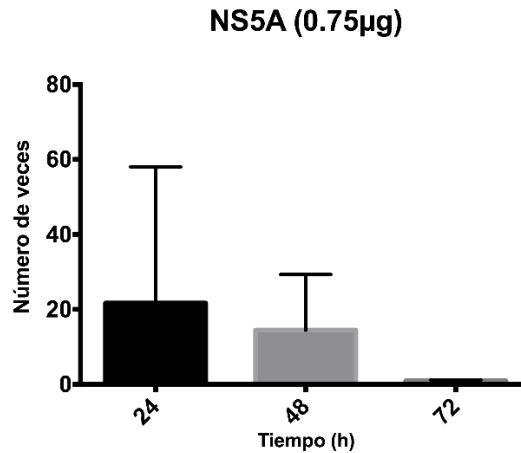


Figura 37: Expresión a nivel transcripcional del gen NS5A del VHC 24, 48 y 72 horas posteriores a la transfección con el plásmido NS5A.

7.7.2 Expresión a nivel transcripcional de los genes FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con NS5A.

Simultáneamente se realizó el estudio de la expresión a nivel transcripcional de FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con el plásmido pFK1. Se estudió la expresión a través del tiempo y se comparó usando como control las células transfectadas con el plásmido vacío.

En la figura 38 se observa una mayor expresión a nivel transcripcional de SNAI1 en las células que expresan el gen NS5A del VHC con respecto al control, sin embargo no parece haber ninguna diferencia en la expresión de FOXC1.

En conclusión NS5A no parece tener ningún efecto sobre la expresión de FOXC1, sin embargo en el caso de SNAI1 existe un incremento en su expresión a nivel transcripcional.

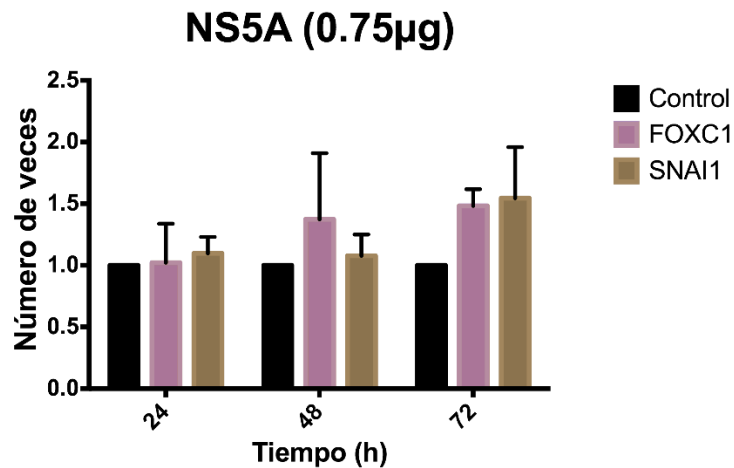


Figura 38: Expresión de FOXC1 y SNAI1 en células transfectadas con NS5A. Se observe una mayor expresión a nivel transcripcional de SNAI1 en las células que expresan los genes de las proteínas no estructurales del VHC. Inversamente se observa una menor expresión de FOXC1 en estas mismas células(los resultados no fueron estadísticamente significativos).

7.8 Transfección transitoria de células HuH-7 con Core.

7.8.1 Expresión a nivel transcripcional de Core.

Se realizó la transfección transitoria tal y como se describe en el apartado de métodos (6.2.11), posteriormente se extrajo el ARN total (6.2.12) de las células transfectadas a las 24, 48 y 72 horas. En la tabla 19 se muestran las concentraciones del ARN extraído de las células transfectadas con Core y pcDNA.



Tiempo	pcDNA	Core
24h	200.7 ng/μl	100 ng/μl
	190 ng/μl	105.3 ng/μl
	100 ng/μl	105.6 ng/μl
48h	224.7 ng/μl	50 ng/μl
	284 ng/μl	101.1 ng/μl
	274.1 ng/μl	194.9 ng/μl
72h	168.2 ng/μl	257 ng/μl
	221.6 ng/μl	252.6 ng/μl
	192.3 ng/μl	235.5ng/μl

Tabla 19: Concentración de ARN extraído de las células transfectadas con Core y el control con pcDNA.

Una vez obtenido el ARN se realizó la retrotranscripción (6.2.13). En la tabla 20 se muestran las concentraciones de cDNA (DNA complementario) obtenido.

Tiempo	pcDNA	Core
24h	1354.6 ng/μl	1588.2 ng/μl
	1468.6 ng/μl	1373.6 ng/μl
	1355 ng/μl	1353.2 ng/μl
48h	1035.3 ng/μl	997.2 ng/μl
	1039.7 ng/μl	1003.3 ng/μl
	1029.7 ng/μl	1010.8 ng/μl
72h	1977.6 ng/μl	1380.6 ng/μl
	1344.4 ng/μl	1362.6 ng/μl
	1877.8 ng/μl	1416.5 ng/μl

Tabla 20: Concentración de cDNA retrotranscrito a partir de ARN extraído de células transfectadas con Core y pcDNA.



Una vez obtenido el cDNA se realizaron diluciones de éste con la finalidad de utilizar 2 μ l conteniendo 100 ug de cDNA para el ensayo de PCR en tiempo real, en el caso de las dos cuantificaciones, VHC y RPS18.

Se realizó la PCR tiempo real de todos los tiempos obtenidos es importante mencionar que se probaron diferentes concentraciones del plásmido a la hora de transfectar las células (0.25, 0.5 y 0.75 μ g) a continuación solo se muestran los resultados de las células transfectadas con 0.75 μ g de plásmido debido a que a esta concentración se encontró una mayor expresión a nivel transcripcional de las proteínas virales.

En la figura 39 se muestra la expresión a nivel transcripcional del gen de la proteína Core del VHC en las células transfectadas con el plásmido de Core, lo cual demuestra el correcto diseño de este plásmido. Se puede observar también como a las 48 horas existe una mayor expresión de este gen.

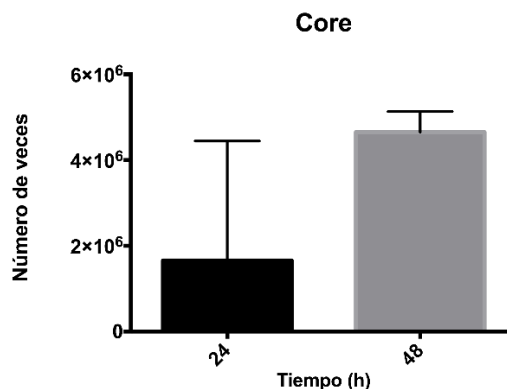


Figura 39: Expresión a nivel transcripcional del gen Core del VHC 24 y 48 horas posteriores a la transfección con el plásmido Core.

7.8.2 Expresión a nivel transcripcional de los genes FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con Core.

Simultáneamente se realizó el estudio de la expresión a nivel transcripcional de FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con el plásmido Core. Se estudió la expresión a través del tiempo y se comparó usando como control las células transfectadas con el plásmido vacío.



En la figura 40 se muestra el análisis de la expresión a nivel transcripcional de los genes FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con el plásmido de Core. Podemos ver una mayor expresión de FOXC1 en las células que expresan la proteína Core de VHC con respecto al control, mientras que se observa una disminución de SNAI1 a las 48 horas. Esto podría significar que la proteína Core induce una regulación positiva de FOXC1.

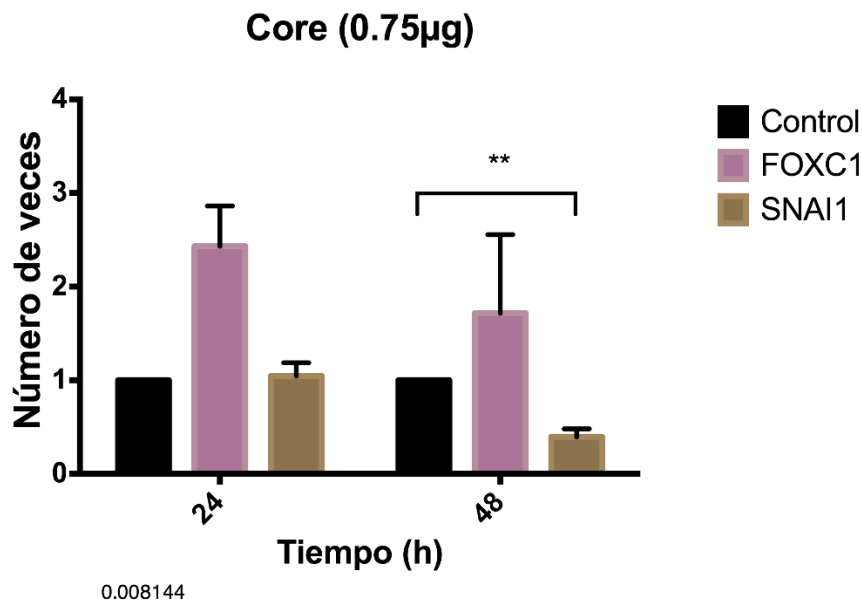


Figura 40: Expresión de FOXC1 y SNAI1 en células transfectadas con Core. Se observa un incremento no significativo en la expresión de FOXC1 y una disminución significativa de SNAI1 a las 48 horas.

7.9 Transfección transitoria de células HuH-7 con los plásmidos pcDNA, Core, NS5A y pFK1, estudio de la expresión a nivel traduccional.

7.9.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Se realizó la transfección transitoria tal y como se describe en el apartado de métodos (6.2.11), posteriormente se realizó la extracción y cuantificación de proteínas totales (6.2.15) empleando el método de Bradford.

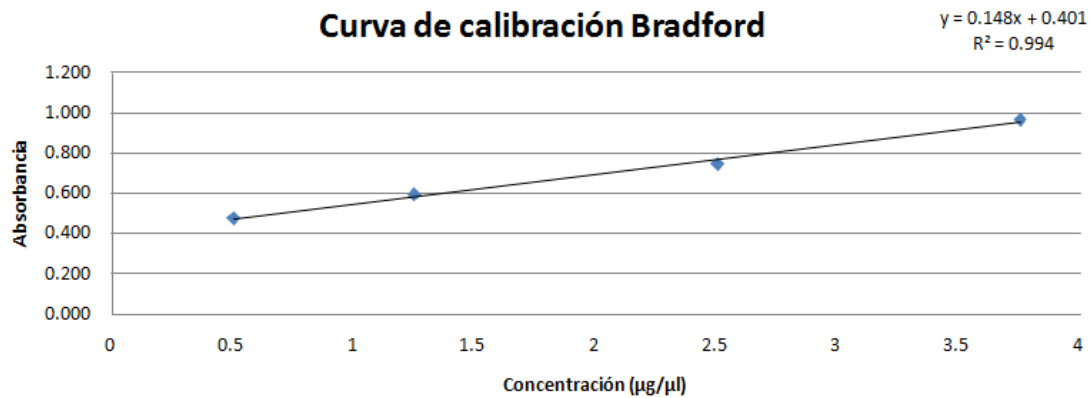


Figura 41: Curva de calibración de proteínas con el método de Bradford. Las mediciones se realizaron por triplicado y se grafica la media de ellas. Se muestra en la esquina superior derecha la ecuación de la recta utilizada y el valor de R.

Una vez cuantificada la proteína se utilizaron 40 µg para correr el gel de poliacrilamida al 10 % (gel separador). Posteriormente se realizó la transferencia del gel a la membrana de PVDF(6.2.16) y se procedió con el Western Blot (6.2.17).

7.9.2 Western Blot.

Se realizó el análisis densitométrico de imágenes y se normalizaron los resultados obtenidos con β-actina. El software utilizado para el análisis fue el ImageJ versión 1.44 p.

En la figura 42 se muestran los resultados de este análisis en células transfectadas 24 horas antes con los plásmidos Core, NS5A, pcDNA y pFK1. Primeramente debemos señalar que en este tiempo no se encontró expresión de NS5A.

En cuanto al plásmido de Core se logró comprobar una vez más su correcto diseño, ya que se logró expresar la proteína en las células transfectadas. Los resultados muestran una disminución en la expresión de FOXC1 en las células transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas virales, por otro lado la expresión de SNAI1 se vio incrementada en las células transfectadas con NS5A y pFK1 contrario a lo que se observa en aquellas transfectadas con el plásmido de Core.

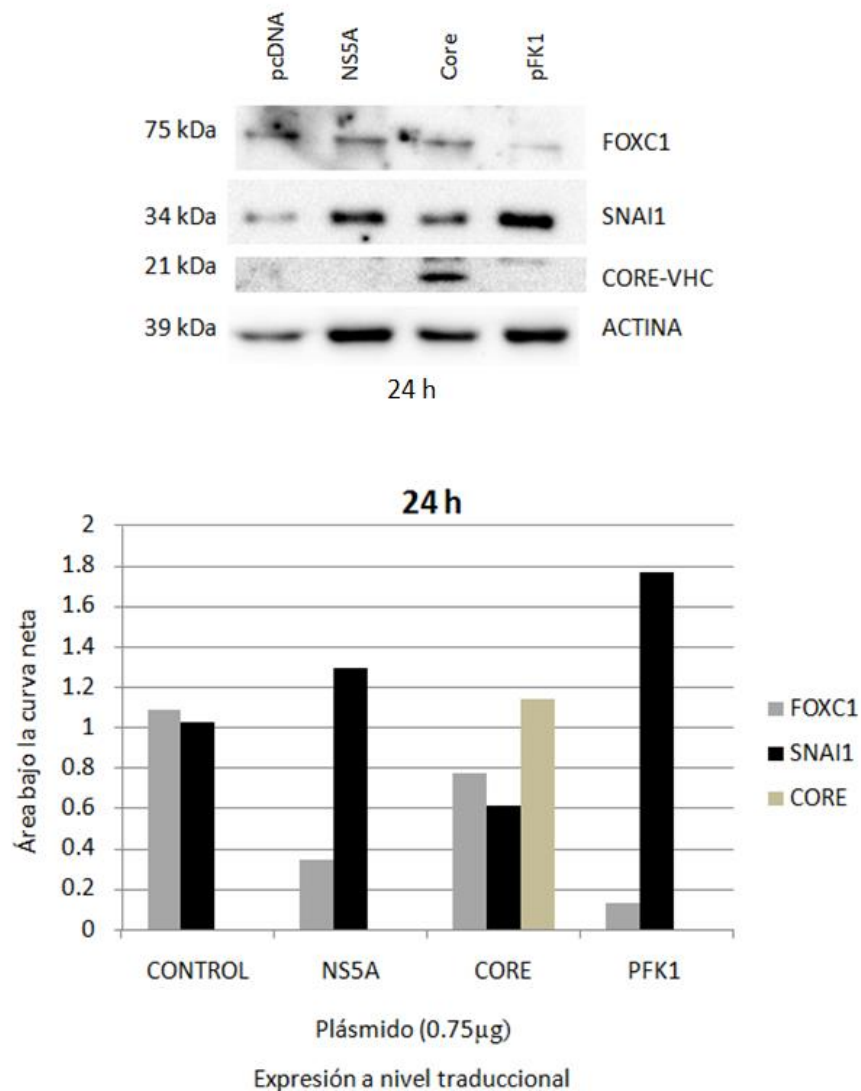
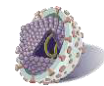


Figura 42: Análisis a nivel traduccional de células transfectadas con los plásmidos pcDNA, NS5A, Core y pFK1. En la región inferior se encuentra el análisis densitométrico mediante el software ImageJ. Podemos observar como a las 24 horas las células transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas virales presentan una disminución en la expresión de FOXC1 con respecto al control. En el caso de SNAI1 se observa un incremento en su expresión en las células transfectadas con NS5A y pFK1. Mientras que se observa una disminución en aquellas transfectadas con el plásmido de Core, sin embargo es necesario repetir estos experimentos para confirmar estos hallazgos.



CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN

El daño hepático crónico causado por la infección con el VHC continúa siendo una causa importante de muerte alrededor del mundo (Lanini, Easterbrook, Zumla, & Ippolito, 2016b), he incluso antes de que esto ocurra los efectos colaterales, incapacitantes, de este daño hepático representan un gasto importante para las familias y los sistemas de salud. (Myers et al., 2014)

Hasta el día de hoy, los mecanismos moleculares responsables de esta patogenia no han sido del todo dilucidados. ¿Qué mecanismos intervienen en el proceso de fibrosis? ¿Cómo es que un virus de ARN, el cual no inserta su material genético en el genoma celular, da lugar a la oncogénesis? ¿Son estas patologías efectos colaterales de mecanismos que favorecen la cronicidad de la infección viral? Estas preguntas se han intentado responder desde diferentes enfoques que incluyen pero no se limitan a las interacciones con el sistema inmune, la activación de las células estelares y el estrés oxidativo. (Novo et al., 2014) (Sebastiani et al., 2014)

La transición epitelial-mesenquimal (TEM) es un proceso fisiológico indispensable para el desarrollo embrionario y la reparación y regeneración de tejidos durante la vida adulta (Kalluri & Weinberg, 2009a). Desde hace años se sabe que la transición epitelial-mesenquimal está íntimamente relacionada con el desarrollo de fibrosis hepática independientemente de su etiología (Choi & Diehl, 2009). Lo que es más importante, se sabe que el VHC es capaz de inducir la TEM en el hepatocito infectado, mediante la expresión de las proteínas virales (E2, NS3, NS4BNS5A y Core) (Bandiera et al., 2016) (Sebastiani et al., 2014). Se ha sugerido que la TEM podría no solo estar relacionada con la patogénesis de la enfermedad, sino que además podría favorecer la cronicidad de la infección viral (Li et al., 2016). Aun no se comprende del todo como es que las proteínas virales interactúan con las vías celulares para favorecer la TEM.

SNAI1 es un factor de transcripción considerado un regulador maestro de la TEM, se ha descrito que la expresión de las proteínas Core y NS4B del VHC son capaces de inducir una regulación positiva de SNAI1 en el hepatocito (Hu et al., 2017) (Abe et al., 2010). Por otra parte FOXC1 también es considerado un orquestador de la TEM, aunque se considera indispensable para el desarrollo embrionario, su expresión durante la vida



adulta se ha visto relacionada con la aparición de diferentes tipos de cáncer (Elian, Yan, & Walter, 2018). Los estudios muestran que la expresión de FOXC1 induce la expresión de SNAI1 favoreciendo la metástasis en el carcinoma hepatocelular (Xia et al., 2013). Aunque se ha estudiado la relación de FOXC1 con el virus de la hepatitis B esta es la primera vez que se estudia su relación con el VHC.

Primeramente se realizó la comparación de las líneas celulares Huh7 (hepatocarcinoma) y Huh7-VHC Replicón la cual expresa constitutivamente las proteínas no estructurales del VHC esto con el fin de estudiar si el virus induce la expresión de FOXC1 y Snai1. Nosotros encontramos que la línea Replicón presenta una mayor expresión de ambos factores de transcripción a nivel transcripcional esto podría significar que en efecto las proteínas virales inducen la expresión de dichos factores, sin embargo a nivel traduccional se observó que existe una menor expresión de FOXC1 y Snai1 este hallazgo inesperado podría deberse a mutaciones adaptativas en esta línea celular que generan algún evento regulatorio del ARN mensajero. Están reportadas varias mutaciones adaptativas en esta línea celular que permiten un equilibrio entre la viabilidad celular y la replicación viral (Blight, 2000). Algunos ejemplos de mutaciones adaptativas se han observado en NS3 y NS5A, otros grupos de trabajo han trasplantado células Replicón con tales mutaciones con el fin de estudiar el efecto en la enfermedad en chimpancés, encontrando que estas no permiten el desarrollo de la enfermedad (Bukh et al., 2002). En resumen aunque la línea Replicón es un buen modelo de la replicación viral está lejos de ser un modelo para el estudio de los efectos patológicos que esta produce. El recordar que tanto FOXC1 como Snai1 generarían un efecto patológico en esta línea celular adherente al inducir la TEM, podría explicar su menor expresión a nivel traduccional.

Con el fin de estudiar el efecto de la expresión de la proteína Core del VHC en las células Huh7 se realizó el diseño de un plásmido que expresa dicha proteína usando el vector de expresión pcDNA 3.1 (+). Se comprobó la expresión del gen Core-VHC a nivel transcripcional y traduccional mediante Western blot y PCR cuantitativa.

Posteriormente se realizaron los ensayos de transfección transitoria de las células Huh7 empleando los plásmidos de Core, pFK1 (expresa todas las proteínas no estructurales del virus), NS5A, y pcDNA (plásmido vacío, como control) con el fin de estudiar el



efecto de la expresión de las proteínas virales en la expresión de FOXC1 y SNAI1. Se llevó a cabo la extracción de ARN a las 24, 48 y 72 horas, y se realizó el estudio de la expresión a nivel transcripcional por medio de PCR cuantitativa.

En el análisis de la expresión a nivel transcripcional de los genes FOXC1 y SNAI1 en las células transfectadas con el plásmido de Core. Podemos ver una mayor expresión de FOXC1 en las células que expresan la proteína Core del VHC con respecto al control, mientras que se observa una disminución de SNAI1 a las 48 horas, sin embargo esto no fue significativo y es necesario repetir el experimento para confirmar estos hallazgos. Esto podría significar que la proteína Core induce una regulación a la alta de FOXC1. Esta es la primera vez que se establece una relación entre la expresión del gen de la proteína Core del VHC y la expresión de FOXC1. La disminución en la expresión de SNAI1 sugiere que FOXC1 no actúa como inductor de SNAI1 en este caso.

En las células transfectadas con pFK1, las cuales expresan los genes de las proteínas no estructurales del VHC, se observa una mayor expresión a nivel transcripcional de SNAI1, cuando las comparamos con el control. Inversamente se observa una menor expresión de FOXC1 en estas mismas células. Se ha reportado que NS4B es capaz de inducir la expresión de SNAI1 (Hu et al., 2017), este experimento muestra que las proteínas virales en conjunto también son capaces de inducir su expresión, lo que nos sugiere que el resto de las proteínas podrían poseer un efecto sinérgico o cuando menos no poseen un efecto antagónico significativo, también podemos concluir que FOXC1 no actúa como inductor de SNAI1 cuando se expresan las proteínas no estructurales del virus.

Los ensayos de transfección transitoria, empleando el plásmido de NS5A, y el estudio a nivel transcripcional arrojaron que NS5A no parece tener ningún efecto sobre la expresión de FOXC1, sin embargo en el caso de SNAI1 existe un incremento en su expresión a nivel transcripcional. El incremento en la expresión de SNAI1 se había observado en el caso de NS4B (Hu et al., 2017). Es la primera vez que se observa una relación con NS5A, también podemos concluir que FOXC1 no aumenta su expresión ni actúa como inductor de SNAI1 cuando se expresa NS5A.

Para terminar quisimos estudiar el efecto de la expresión de las proteínas virales en la expresión de FOXC1 y SNAI1 a nivel traduccional empleando la técnica de Western

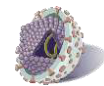


Blot, para lo cual se realizaron los ensayos de transfección transitoria de las células Huh7 empleando los plásmidos de Core, pFK1 (expresa todas las proteínas no estructurales del virus), NS5A, y pcDNA (plásmido vacío, como control).

En cuanto al plásmido de Core se logró comprobar una vez más su correcto diseño, ya que se logró expresar la proteína en las células transfectadas.

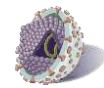
Los resultados del western Blot muestran una disminución en la expresión de FOXC1 en las células transfectadas con los plásmidos que expresan las proteínas virales, por otro lado la expresión de SNAI1 se vio incrementada en las células transfectadas con NS5A y pFK1 contrario a lo que se observa en aquellas transfectadas con el plásmido de Core.

Estos resultados nos sugieren que las proteínas no estructurales en conjunto y NS5A de forma aislada son capaces de inducir la expresión de SNAI1 a las 24 horas, Este efecto no parece ser dependiente de la expresión de FOXC1, sin embargo debido a que FOXC1 es una proteína que se transloca al núcleo su efecto podría depender no de un incremento en la expresión sino de un incremento en la translocación, por lo cual podría ser necesario el estudio particular de las proteínas nucleares (Elian et al., 2018).



CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES

- Se logró el diseño de un vector de expresión para la proteína Core del VHC. Se comprobó su funcionalidad para la expresión a nivel transcripcional y traduccional, mediante PCR en tiempo real y Western Blot, en células transfectadas.
- Se encontró una mayor expresión a nivel transcripcional de FOXC1 y SNAI1 en la línea celular HuH7-VHC Replicón al compararla con la línea celular Huh7, sin embargo contrario a lo esperado se observó una menor expresión a nivel traduccional de SNAI1 en la línea celular que expresa las proteínas virales, esto podría deberse a mutaciones adaptativas en el replicón subgenómico (Krieger et al., 2001).
- En cuanto a la transfección transitoria con pFK1 se observó que los genes de las proteínas no estructurales en conjunto inducen un incremento en la expresión a nivel transcripcional de SNAI1 paralelo a una disminución de FOXC1.
- La transfección transitoria del plásmido NS5A no parece tener ningún efecto sobre la expresión a nivel transcripcional de FOXC1, sin embargo en el caso de SNAI1 existe un incremento en su expresión.
- Se observó una mayor expresión de FOXC1 en las células que expresan la proteína Core de VHC con respecto al control, mientras que a las 48 horas la expresión a nivel transcripcional de SNAI1 se encuentra disminuida. Esto podría significar que la proteína Core induce una regulación a la alta de FOXC1.
- El estudio de la expresión a nivel traduccional de FOXC1 y SNAI1 en células transfectadas con pcDNA, pFK1, NS5A y Core mostro una disminución de FOXC1 a las 24 horas en las células transfectadas con los plásmidos que expresan los genes de las proteínas virales. En cuanto a SNAI1 se observó una mayor expresión en las células transfectadas con NS5A y pFK1.

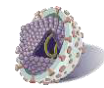


REFERENCIAS

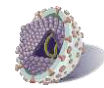
- Abe, M., Koga, H., Yoshida, T., Hanada, S., Kawaguchi, T., Sakata, M., ... Sata, M. (2010). Abstract 2309: Hepatitis C virus core protein in combination with interleukin-6 induces epithelial-mesenchymal transition through upregulation of Snail and E2A in human hepatocyte-derived cells. *Cancer Research*, 70(8 Supplement), 2309–2309. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM10-2309>
- Angadi, P., & Kale, A. (2015). Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview. *Indian Journal of Health Sciences*, 8(2), 77. <https://doi.org/10.4103/2349-5006.174233>
- Arrese, M., Bellentani, S., Bergasa, N. V., York, N., Buti, M., Caldwell, S., ... Wedemeyer, H. (2015). Mexican Consensus on the Diagnosis and Management of Hepatitis C Infection. *Annals of Hepatology*, 12(Suppl 1), S1–S48.
- Bandiera, S., Billie Bian, C., Hoshida, Y., Baumert, T. F., & Zeisel, M. B. (2016). Chronic hepatitis C virus infection and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Current Opinion in Virology*, 20, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.010>
- Barrallo-Gimeno, A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132(14), 3151–3161. <https://doi.org/10.1242/dev.01907>
- Baumert, T. F., Jühling, F., Ono, A., & Hoshida, Y. (2017). Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals. *BMC Medicine*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0815-7>
- Blight, K. J. (2000). Replication in Cell Culture, 617(December), 1972–1974.
- Bose, S. K., Meyer, K., Di Bisceglie, A. M., Ray, R. B., & Ray, R. (2012). Hepatitis C Virus Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Primary Human Hepatocytes. *Journal of Virology*, 86(24), 13621–13628. <https://doi.org/10.1128/JVI.02016-12>
- Bryan-Marrugo, O. L., Ramos-Jiménez, J., Barrera-Saldaña, H., Rojas-Martínez, A., Vidaltamayo, R., & Rivas-Estilla, A. M. (2015). History and progress of antiviral drugs: From acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. *Medicina Universitaria*, 17(68), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.05.003>
- Bukh, J., Pietschmann, T., Lohmann, V., Krieger, N., Faulk, K., Engle, R. E., ... Bartenschlager, R. (2002). Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14416–14421. <https://doi.org/10.1073/pnas.212532699>
- Choi, S. S., & Diehl, A. M. (2009). Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(6), 2007–13. <https://doi.org/10.1002/hep.23196>
- Chung, S., Jin, Y., Han, B., Qu, Y., Gao, B., Giuliano, A. E., & Cui, X. (2017). Identification of EGF-NF-κB-FOXC1 signaling axis in basal-like breast cancer. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0180-3>
- Clément, S., Pascarella, S., Conzelmann, S., Gonelle-Gispert, C., Guilloux, K., & Negro, F. (2010). The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *Journal of Hepatology*, 52(5), 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.10.035>
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in



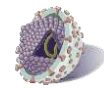
- bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–4. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.8.2110>
- Colpitts, C. C., & Baumert, T. F. (2016). Hepatitis C virus cell entry: a target for novel antiviral strategies to address limitations of direct acting antivirals. *Hepatology International*, 10(5), 741–748. <https://doi.org/10.1007/s12072-016-9724-7>
- Elian, F. A., Yan, E., & Walter, M. A. (2018). FOXC1, the new player in the cancer sandbox The FOX family and cancer. *Oncotarget*, 9(8), 8165–8178. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22742>
- Han, B., Bhowmick, N., Qu, Y., Chung, S., Giuliano, A. E., & Cui, X. (2017). FOXC1: an emerging marker and therapeutic target for cancer. *Oncogene*, 36(28), 3957–3963. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.48>
- HCV Epidemiology - Summary Slides (updated January 19, 2015). (n.d.).
- Hepatitis C - Síntomas y causas - Mayo Clinic. (n.d.). Retrieved November 20, 2017, from <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/hepatitis-c/symptoms-causes/syc-20354278>
- Hu, B., Xie, S., Hu, Y., Chen, W., Chen, X., Zheng, Y., & Wu, X. (2017). Hepatitis C virus NS4B protein induces epithelial-mesenchymal transition by upregulation of Snail. *Virology Journal*, 14(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0737-1>
- Huang, C.-F., Yeh, M.-L., Huang, C.-I., Lin, Y.-J., Tsai, P.-C., Lin, Z.-Y., ... Chen, C.-J. (2017). Risk of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma between subjects with spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Oncotarget*, 8(27), 43925–43933. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14937>
- Huang, L., Huang, Z., Fan, Y., He, L., Ye, M., Shi, K., ... Li, Q. (2017). FOXC1 promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma through the PI3K-AKT signal pathway. *American Journal of Translational Research*, 9(3), 1297–1306. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28386355>
- Huang, W., Chen, Z., Zhang, L., Tian, D., Wang, D., Fan, D., ... Xia, L. (2015). Interleukin-8 Induces Expression of FOXC1 to Promote Transactivation of CXCR1 and CCL2 in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines and Formation of Metastases in Mice. *Gastroenterology*, 149(4), 1053–1067. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.058>
- Igloi, Z., Kazlauskas, A., Saksela, K., MacDonald, A., Mankouri, J., & Harris, M. (2015). Hepatitis C virus NS5A protein blocks epidermal growth factor receptor degradation via a proline motif- dependent interaction. *Journal of General Virology*, 96(8), 2133–2144. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000145>
- Iqbal, J., McRae, S., Mai, T., Banaudha, K., Sarkar-Dutta, M., & Waris, G. (2014). Role of hepatitis C virus induced osteopontin in epithelial to mesenchymal transition, migration and invasion of hepatocytes. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087464>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. a. (2009a). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009b). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–8. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Konjeti, V. R., & John, B. V. (2018). Interaction Between Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis C Eradication With Direct-acting Antiviral Therapy. *Current*



- Treatment Options in Gastroenterology*, 16(2), 203–214.
<https://doi.org/10.1007/s11938-018-0178-y>
- Koutsoudakis, G., Forns, X., & Pérez-del-Pulgar, S. (2013). Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterología Y Hepatología*, 36(4), 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2012.11.005>
- Krieger, N., Lohmann, V., & Bartenschlager, R. (2001). Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations. *Society*, 75(10), 4614–4624. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4614>
- Lanini, S., Easterbrook, P. J., Zumla, A., & Ippolito, G. (2016a). Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.035>
- Lanini, S., Easterbrook, P. J., Zumla, A., & Ippolito, G. (2016b). Hepatitis C: global epidemiology and strategies for control. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.035>
- Lee, S. J., Kim, K. H., & Park, K. K. (2014). Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition. *World Journal of Hepatology*, 6(4), 207–216. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i4.207>
- Li, Q., Sodroski, C., Lowey, B., Schweitzer, C. J., Cha, H., Zhang, F., & Liang, T. J. (2016). Hepatitis C virus depends on E-cadherin as an entry factor and regulates its expression in epithelial-to-mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(27), 7620–7625. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602701113>
- Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B., & Wang, T. (2009). Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. *Journal of Virology*, 83(4), 2011–2014. <https://doi.org/10.1128/JVI.01888-08>
- Manns, M. P., Czaja, A. J., Gorham, J. D., Krawitt, E. L., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., & Vierling, J. M. (2010). Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology*, 51(6), 2193–2213. <https://doi.org/10.1002/hep.23584>
- Manzanares Ibañez, M. (2011). Estudio de genética del virus de la hepatitis C en cultivos celulares. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 5(2), 11–35. https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2011.v5.n2.37329
- Márquez-Rosales, M. G., Santoscoy-Tovar, F. A., & Montoya-Fuentes, H. (2008). *Revista Mexicana de Patología Clínica. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* (Vol. 55). AMERBAC. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=16126>
- Martínez-Bauer, E., Forns, X., Armelles, M., Planas, R., Solà, R., Vergara, M., ... Bruguera, M. (2008). Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *Journal of Hepatology*, 48(1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.031>
- Myers, R. P., Krajden, M., Bilodeau, M., Kaita, K., Marotta, P., Peltekian, K., ... Sherman, M. (2014). Burden of Disease and Cost of Chronic Hepatitis C Virus Infection in Canada. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28(5), 243–250. <https://doi.org/10.1155/2014/317623>
- Nie, D., Shan, X., Nie, L., Duan, Y., Chen, Z., Yang, Y., ... Tang, N. (2015). Hepatitis C virus core protein interacts with Snail and histone deacetylases to promote the metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, (September), 1–10. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.428>
- Novo, E., Cannito, S., Paternostro, C., Bocca, C., Miglietta, A., & Parola, M. (2014). Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 548, 20–37. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.01>



- OMS | Hepatitis C. (2017). *WHO*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/es/>
- Ono, A., Goossens, N., Finn, R. S., Schmidt, W. N., Thung, S. N., Im, G. Y., & Hoshida, Y. (2017). Persisting risk of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus cure monitored by a liver transcriptome signature. *Hepatology*, *66*(4), 1344–1346. [https://doi.org/10.1002/HEP.29203@10.1002/\(ISSN\)1527-3350\(CAT\)VIRTUALISSUES\(VI\)CLINICALOBSERVATIONSINHEPATOLOGY](https://doi.org/10.1002/HEP.29203@10.1002/(ISSN)1527-3350(CAT)VIRTUALISSUES(VI)CLINICALOBSERVATIONSINHEPATOLOGY)
- Panebianco, C., Saracino, C., & Pazienza, V. (2014). Epithelial-mesenchymal transition: molecular pathways of hepatitis viruses-induced hepatocellular carcinoma progression. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *35*(8), 7307–7315. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2075-x>
- Polyak, S. J. (2001). Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein Induces Interleukin-8 , Leading to Partial Inhibition of the Interferon-Induced Antiviral Response Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein Induces Interleukin-8 , Leading to Partial Inhibition of the Interfero. *J Virol*, *75*(13), 6095–6106. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.6095>
- Preciado, M. V., Valva, P., Escobar-Gutierrez, A., Rahal, P., Ruiz-Tovar, K., Yamasaki, L., ... Cruz-Rivera, M. (2014). Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(43), 15992–6013. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.15992>
- Sambrook, J., & Russell, R. . (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold spring harbor laboratory press, Ed.) (3rd ed.). cold spring harbor, N.Y.
- Schaller, T., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., & Bartenschlager, R. (2007). Analysis of Hepatitis C Virus Superinfection Exclusion by Using Novel Fluorochrome Gene-Tagged Viral Genomes. *Journal of Virology*, *81*(9), 4591–4603. <https://doi.org/10.1128/JVI.02144-06>
- Sebastiani, G., Gkouvatsos, K., & Pantopoulos, K. (2014). Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(32), 11033–53. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11033>
- Shire, N. J., & Sherman, K. E. (2015). Epidemiology of Hepatitis C Virus. A Battle on New Frontiers. *Gastroenterology Clinics of North America*, *44*(4), 699–716. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.07.002>
- Tagle Arróspide, M., & Bussalleu Rivera, A. (2015). *Hepatología 2015*.
- Tai, D. I., Tsai, S. L., Chen, Y. M., Chuang, Y. L., Peng, C. Y., Sheen, I. S., ... Liaw, Y. F. (2000). Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, *31*(3), 656–664. [https://doi.org/S0270913900728941 \[pii\]r10.1002/hep.510310316](https://doi.org/S0270913900728941 [pii]r10.1002/hep.510310316)
- Terrault, N. A., Dodge, J. L., Murphy, E. L., Tavis, J. E., Kiss, A., Levin, T. R., ... Alter, M. J. (2013). Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: The HCV partners study. *Hepatology*, *57*(3), 881–889. <https://doi.org/10.1002/hep.26164>
- Tscherne, D. M., Evans, M. J., von Hahn, T., Jones, C. T., Stamatakis, Z., McKeating, J. A., ... Rice, C. M. (2007). Superinfection Exclusion in Cells Infected with Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, *81*(8), 3693–3703. <https://doi.org/10.1128/JVI.01748-06>
- Vanhommerig, J. W., Lambers, F. A. E., Schinkel, J., Geskus, R. B., Arends, J. E., van de Laar, T. J. W., ... van der Veldt, W. (2015). Risk Factors for Sexual



- Transmission of Hepatitis C Virus Among Human Immunodeficiency Virus-Infected Men Who Have Sex With Men: A Case-Control Study. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3), ofv115. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv115>
- Vos, T., Barber, R. M., Bell, B., Bertozzi-Villa, A., Biryukov, S., Bolliger, I., ... Murray, C. J. L. (2015). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 386(9995), 743–800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)
- Wang, J., Li, W., Zheng, X., Pang, X., & Du, G. (2018). Research progress on the forkhead box C1. *Oncotarget*, 9(15), 12471–12478. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22527>
- Wang, J., Ray, P. S., Sim, M.-S., Zhou, X. Z., Lu, K. P., Lee, A. V., ... Cui, X. (2012). FOXC1 regulates the functions of human basal-1. Wang J, Ray PS, Sim M-S, Zhou XZ, Lu KP, Lee A V, et al. FOXC1 regulates the functions of human basal-like breast cancer cells by activating NF-κB signaling. *Oncogene* [Internet]. 2012 Nov 8 [cited 2017 Nov 2]. *Oncogene*, 31(45), 4798–4802. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.635>
- Westbrook, R. H., & Dusheiko, G. (2014). Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 61(1), S58–S68. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.012>
- Xia, L., Huang, W., Tian, D., Zhu, H., Qi, X., Chen, Z., ... Wu, K. (2013). Overexpression of forkhead box C1 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 57(2), 610–624. <https://doi.org/10.1002/hep.26029>
- Yang, L., Jung, Y., Omenetti, A., Witek, R. P., Choi, S., Vandongen, H. M., ... Diehl, A. M. (2008). Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(8), 2104–13. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0115>
- Y Tratamiento De La, D. (n.d.). Evidencias y Recomendaciones. Retrieved from http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/038_GPC_InsufHepaticaCronica/IMSS_038_08_EyR.pdf
- Zeisel, M. B., & Baumert, T. F. (2017). Clinical development of hepatitis C virus host-targeting agents. *Lancet (London, England)*, 389(10070), 674–675. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30043-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30043-0)
- Zeisel, M. B., Lupberger, J., Fofana, I., & Baumert, T. F. (2013). Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C-Perspectives and challenges. *Journal of Hepatology*, 58(2), 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.09.022>
- Zeisel, M., Crouchet, E., Baumert, T., & Schuster, C. (2015). Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*, 7(11), 5659–5685. <https://doi.org/10.3390/v7112898>
- Zeng, Q. L., Li, Z. Q., Liang, H. X., Xu, G. H., Li, C. X., Zhang, D. W., ... Yu, Z. J. (2016). Unexpected high incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C in the era of DAAs: Too alarming? *Journal of Hepatology*, 65(5), 1068–1069. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.029>



CAPITULO 9: ANEXOS

9.1 Cultivo celular.

9.1.1 Suplementación de medio de cultivo

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Mechero de Bunsen.
- Pipetor

Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (ADMEM).

Reactivos

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (ADMEM). 500 mL. GIBCO. Cat. 12491015.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. GIBCO. Cat. 16000-044.
- Solución de antibiótico penicilina/estreptomicina 100X. 100 mL. GIBCO. Cat. 15070-063.
- Aminoácidos no esenciales. 10 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 11140-050.
- *L*-Glutamina. 200 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 25030081.

Protocolo

Manejar el medio de cultivo dentro de la campana de flujo laminar. Para suplementar 500 ml de medio ADMEM al 2% se añadirán 10 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de aminoácidos no esenciales (100X), 5 mL de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de *L*- glutamina (100X).



9.1.2 MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm². Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
- Botellas para cultivo celular de 75 cm². Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641.
- Pipeta pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.

Reactivos

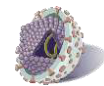
- Medio de cultivo ADMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X estéril.
- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. Marca GIBCO. Cat. 15050057.

Equipo

- Campana de flujo laminar clase II.
- Bomba de vacío.
- Centrífuga.
- Incubadora con tanque de CO₂.

Protocolo para células HuH-7

1. Retirar el medio de cultivo de la botella con células confluentes por aspiración.
2. Lavar las células con una alícuota de PBS estéril 1X. Por cada 25 cm² de superficie se debe emplear 1 mL de buffer de lavado. Realizar movimientos circulares para permitir que la solución entre en contacto con todas las unidades de la monocapa y pueda remover la mayor cantidad posible de detrito celular. Retirar el PBS 1X por aspiración.
3. Añadir tripsina. Se utilizará 1 mL de tripsina en una botella de 25 cm² y 3 ml para botellas de 75 cm².
4. Incubar a 37°C durante 5 minutos. Procurar no exceder el tiempo para que la enzima no comience a degradar la membrana celular.
5. Neutralizar la actividad de la tripsina adicionando un volumen 1:1 de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal.
6. Recolectar la suspensión celular en un tubo falcon de 15 mL.
7. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Cuidadosamente retirar el medio de cultivo utilizado para neutralizar la tripsina.



9. Añadir medio de cultivo nuevo dependiendo del tamaño del botón celular obtenido. Se puede utilizar 2 mL para resuspender el botón celular obtenido a partir de una botella semiconfluyente de 25 cm²; mientras que un botón celular proveniente de una botella semiconfluyente de 75 cm² se puede resuspender en 3 o 4 mL de medio.
10. Resuspender completamente con ayuda de una pipeta de 2 ml (o con una puntilla de 1000 µl) el botón celular en el medio nuevo hasta observar que no hay cúmulos flotando.
11. Tomar de la suspensión de células la alícuota necesaria y colocarla en una botella que cuenta con la cantidad de medio nuevo correspondiente. (5 mL a botella de 25 cm² y 9 mL de 75 cm²)
12. Colocar la botella en la incubadora a 37 °C con 5% CO₂.

Observaciones

- La tripsina, el SBF, el antibiótico y el medio de cultivo se encuentren a temperatura de 37 °C o bien temperatura ambiente al momento de utilizarlos.
- Las células no deben exponerse más de 10 minutos al PBS 1X y no más de 5 minutos a la tripsina.
- La suspensión celular obtenida al neutralizar la tripsina con medio de cultivo suplementado, se centrifuga para asegurar un nivel de compactación homogéneo. Cuando se disgrega de forma correcta se evita la formación de cúmulos celulares.
- Si se emplean micropipetas automáticas, jamás permitir la entrada del vástago a las botellas, ya sean de cultivo celular o las correspondientes a los reactivos en uso.

9.1.3 RECUENTO CELULAR

Para el recuento de células viables se utiliza un colorante vital, el azul tripano. Las células vivas captarán el colorante pero lo expelerán al medio, mientras que las células muertas lo mantendrán en su interior. Generalmente se preparan diluciones 1:4 o 1:8 de la suspensión celular a contabilizar. El resultado se obtiene multiplicando el número de células contadas en la cámara de Neubauer por el valor de la dilución realizada (4 u 8) por el valor del factor de la cámara (10,000).

Material

- Tubos eppendorf de 0.6 mL.
- Cultivos de células HuH-7



Reactivos

- Medio de cultivo ADMEM suplementado al 2% con suero fetal bovino.
- Colorante azul tripano. 100 mL. Marca GIBCO. Cat. 15250-061.

Equipo

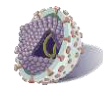
- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio.
- Incubadora con tanque de CO₂.

Protocolo

1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión (el volumen dependerá del botón celular obtenido) en medio nuevo.
2. Hacer la siguiente dilución como sigue en tubo de 600 µl; 60µl de medio de cultivo, 10 µl de células en suspensión y 10µl de azul de Tripano.
3. Mezclar con ayuda de una puntilla de 200 µl el volumen del tubo, subiendo y bajando su contenido sin formar burbujas.
4. Depositar 10 µl de la suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.
5. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas de 4 x 4 de la cámara. Registrar los números.
6. Contar el número de células en el cuadrante central de 5 x 5. Registrar la cantidad. (El número obtenido con el promedio de las cuadrículas de 4 x 4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5 x 5)
7. Realizar el cálculo del total de células empleando la siguiente fórmula:

$$\text{No. células/mL} = (\text{Promedio } 4 \times 4) (\text{Factor de dilución}) (10,000)$$

8. Multiplicar el número de células/ml por el volumen en el cual se resuspendieron y disgregaron las células del cultivo para obtener la cantidad total de células producidas.
9. Con respecto al total de células contabilizadas y el volumen total, colocar el volumen correspondiente al número de células deseado en la botella o placa de cultivo.



9.1.4 CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Material

- Cultivos celulares confluentes.
- Micropipetas.
- Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.

Reactivos

- Suero bovino fetal. Marca GIBCO.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grado Biología molecular. 100 mL. Marca Sigma. Cat. D2650.
- Hielo.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de presión y vacío.
- Centrífuga.
- Ultracongelador Revco.
- Contenedor para congelación, “Mr. Frosty” Nalgene®

Protocolo para células HuH-7

1. Preparar crioviales a congelar. Etiquetar cada uno para evitar exposición de células en DMSO a temperatura ambiente.
2. Cosechar células HuH-7 siguiendo el protocolo de subcultivo hasta la obtención del botón celular.
3. Remover completamente el medio utilizado para neutralizar la tripsina, empleando una micropipeta de 1000 μ l y procurando no romper el botón celular.
4. Resuspender células en suero bovino fetal completo. Añadir tanto suero como sea necesario para obtener una suspensión con una concentración final de 1.5 a 2 millones de células por ml (tomando en cuenta que se tomarán 900 μ l para cada vial).
5. Depositar en cada criovial 100 μ l de DMSO.
6. Depositar en cada vial 900 μ L de la suspensión de células en suero bovino fetal.
7. Almacenar células en Mr. Frosty, el cual se encuentra a temperatura ambiente.
8. Colocar Mr. Frosty en ultracongelador Revco a -80°C .



9. 24 horas después retirar las células congeladas del Mr. Frosty y almacenar en ultracongelador Revco a -80°C . Las células congeladas y almacenadas a esta temperatura tienen caducidad de un año.

9.1.5 DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm². Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.

Reactivos

- Medio de cultivo. HuH-7: ADMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Microscopio.
- Incubadora.

Protocolo

1. Atemperar el medio de cultivo a utilizar para sembrar las células.
2. Depositar 5 ml de medio de cultivo atemperado en una botella de 25 cm².
3. Descongelar inmediatamente el vial con células por inmersión en baño de agua a 37°C .
4. Depositar suavemente la alícuota completa del criovial y homogenizar el contenido de la botella con movimientos circulares suaves.
5. Revisar al microscopio las células recién depositadas en la botella de cultivo.
6. Incubar botella de cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO_2 .

9.2 Virus Vaccinia

9.2.1 Preparación de virus vaccinia

Material

- Cultivos celulares HeLa (VPH 18+)
- Micropipetas.



- Recipiente para desechos biológicos
- Botellas para cultivo celular de 75 cm². Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641
- Tubos falcón de 15 mL Marca Corning. Cat. 430053.

Reactivos

- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X estéril.
- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL Marca GIBCO. Cat. 15050057.
- Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Cloro 10%

Equipo

- Campana de flujo laminar clase II
- Incubadora de CO₂
- Centrífuga para tubos falcón de 15 y 50 mL

Protocolo

1. Crecer las células HeLa (VPH 18+) a una confluencia superior del 80% en placas de 75 cm².
2. Retirar el medio de cultivo y añadir 3 mL de medio ADMEM suplementado. Infeccionar las células con 60 µl del stock Del virus *vaccinia*(Infección) (Fuerst, Niles et al. 1986).
3. Colocar la botella de cultivo en la incubadora y moverla suavemente cada 10 min. durante 1.5 h.
4. Después del tiempo de infección (1.5 h), retirar el medio y agregar 10 mL de medio ADMEM suplementado.
5. Dos días después de la infección, una porción de células estará en suspensión, mientras que el resto de las células estará adherida a la superficie de crecimiento. Recuperar las células que están en suspensión y colocarlas en un tubo falcón de 50 mL.
6. Empastillar las células contenidas en el tubo falcon de 50 mL y eliminar el sobrenadante. (Centrifugar 5 min a 1000 rpm).
7. Lavar la botella de cultivo con 5 mL de PBS 1X y colocarlo en el tubo falcón de 50 ml (del paso No. 5). Centrifugar nuevamente 5 min a 1000 rpm y desechar sobrenadante.
8. Adicionar 3 mL de Tripsina/EDTA a la botella de 75 cm² para despegar las células que aún están adheridas. Colocar estas células en el tubo falcón de 50 ml que contiene las células ya centrifugadas.
9. Lisar las células que están contenidas en el tubo falcón de 50 ml en hielo por 5 min y a 37°C en baño maría por 5 min. Repetir el proceso 3 veces.



10. Añadir 3 ml más de Tripsina/EDTA al tubo falcón de 50 ml (3 ml por cada botella de 75 cm²) e incubar el tubo a 37 °C por 1 hora.
11. Centrifugar y coleccionar el sobrenadante. Hacer alícuotas y almacenar a -80 °C.

9.2.2 Evaluación del efecto citopático del virus vaccinia

Material

- Cultivo celular.
- Micropipetas.
- Recipiente para desechos biológicos
- Placas para cultivo celular de 6 pozos. (35mm x 10 mm)

Reactivos

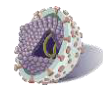
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X estéril.
- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. Marca GIBCO. Cat. 15050057.
- Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Cloro al 10 %

Equipo

- Campana de flujo laminar clase II
- Incubadora de CO₂
- Centrífuga para tubos falcón de 15 y 50 mL

Protocolo

1. Sembrar 2x10⁵ células en cada pozo de una placa de 6 pozos.
2. 24 h después retirar el medio y adicionar 1 ml de medio ADMEM suplementado con diferentes cantidades del stock del virus vaccinia (0.5, 0.25 y 0.1 µl).
3. Incubar la placa a 37 °C por 2 h.
4. 2 horas después de la infección adicionar 1 mL de medio ADMEM suplementado a cada pozo.
5. Observar al microscopio el efecto citopático a las 24, 48 y 72 horas después de la infección.



Observaciones

- Lavarse las manos antes y después de trabajar con el virus vaccinia.
- Colocar las puntillas en un recipiente para desechos biológicos o en cloro al 10%.
- Agregar cloro al 10% a las botellas en donde se realizó la infección.

9.3 Proteínas

9.3.1 Extracción de proteínas

Material

- Placa de cultivo celular
- Buffer de Lisis 1X
- Tableta de inhibidores de proteasas marca Roche # 1697498
- Scrapers de 25 cm marca Corning # 3010

Equipo

- Centrífuga refrigerada

Protocolo

1. Eliminar el medio de la placa con pipeta y puntilla desechable.
2. Agregar 50µl de PBS frío para humedecer la superficie.
3. Raspar con scraper estéril el contorno de la mitad de la caja y el centro en un solo sentido, girando la placa en sentido de las manecillas de reloj, a modo de colectar las células en todas las posiciones.
4. Transferir el líquido a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
5. Añadir 50 µl más de PBS 1x a la placa, raspar de nuevo y transferir al eppendorf. Depositar en hielo.
6. Dar una centrifugación rápida y retirar el sobrenadante. Repetir la centrifugación rápida y eliminar el remanente de líquido.
7. Adicionar un volumen 1:1 de buffer de lisis con respecto al pellet obtenido, aproximadamente 20 µl.
8. Incubar en hielo por 20 min.
9. Centrifugar 5 min, a 13,000 rpm a 4°C.
10. Retirar el sobrenadante (proteína) y pasarlo a un tubo nuevo.
11. Almacenar a -80°C hasta su uso.



Observaciones

- El PBS 1x se necesita frío (4°C) para preservar de mejor manera las células hasta la extracción de proteínas.
- Es importante eliminar la mayor cantidad de sobrenadante de medio y dejar la menor cantidad posible de líquido sin perturbar la pastilla celular debido que un exceso de líquido podría diluir la proteína a extraer.
- En cada ronda de experimentos se usaron cultivos de células Huh-7 (parental y replicón) del mismo pasaje; se trabajó con células con número de pasaje interno 20 hasta 30.

9.3.2 Curva estándar de referencia de proteínas

Material

- Albúmina Sérica Bovina (BSA)
- Placa de 96 pozos
- Extracto proteico
- Reactivo de Bradford marca BIORAD #500-0006, 450 mL

Equipo

- Lector de ELISA ELX800

Protocolo

1. Preparar una solución stock de BSA a una concentración de 100 mg/mL, se recomienda un volumen final de 1 mL.
2. Diluir esta solución inicial 100 veces para obtener una segunda de 1 000 µg/mL.
3. Diluir la solución de 1 000 µg/mL 10 veces más para preparar una solución de 100 µg/mL, con la cual se prepararán los 5 estándares de la curva.
4. A continuación se muestra las cantidades de los diferentes reactivos a mezclar para la preparación de los estándares directamente en la microplaca, con un volumen final de 200 µl, usando la solución stock de 100 µg/mL.

Estándar (µg/mL)	Reactivo de Bradford (µl)	Sol. Stock de proteína(µl)	Agua miliQ(µl)
0	40	--	160
1	40	2	158
5	40	10	150
10	40	20	140



15	40	30	130
20	40	40	120

5. Mezclar, dejar reposar por 5 min y leer a 600 nm de longitud de onda.

6. Con las absorbancias, construir la curva de calibración y calcular la ecuación de la recta con la que se hará la estimación de la cantidad de proteína.

Observaciones:

- Para las soluciones stock, el volumen de preparación recomendado es de 1 mL.
- La evaluación de los estándares debe hacerse por triplicado, es recomendable que el coeficiente de variación sea menor al 5% y el coeficiente de correlación de la curva de, al menos, 0,980.

Cuantificación

1. Preparar en una microplaca de 96 pozos lo siguiente:
 1. Blanco 160 μ l de agua miliQ + 40 μ l de reactivo de Bradford Muestra 159 μ l de agua miliQ + 40 μ l de reactivo de Bradford + 1 μ l de extracto de proteína sin diluir o diluido 1:3 o 1:5
 2. Dejar reposar la reacción, luego de mezclar bien, por 5 min.
 3. Leer en el lector de ELISA a 600 nm, seleccionando la opción #12 (Alamar 600).
 4. Estimar la concentración haciendo el cálculo correspondiente con la ecuación de la recta previamente obtenida de la curva estándar de referencia.

Observaciones:

- Este método en microplaca permite que la reacción se realice con un volumen mínimo de muestra.
- Una vez preparada la reacción es estable por 1 hora.

9.3.3 SDS-PAGE

1. Preparar un gel de poliacrilamida de 7x10 cm con el gel separador a una concentración de 10% y el concentrador al 5%. Dejar polimerizar.
2. Tomar 20(Oxiblot) o 40(Western blot) μ g de proteína y mezclar con buffer de desnaturalización en una proporción 1:4. La mezcla puede ajustarse para tener un volumen manejable de 10-12 μ L, aunque puede cargarse menos, 2-3 μ L.



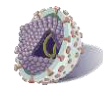
3. Desnaturalizar las proteínas calentado a 94°C por 5 min en thermomixer y poner en hielo.
4. Armar la cámara, poner buffer de corrida 1x y cargar las muestras, incluyendo el marcador de peso molecular.
5. Correr a 80 V por aproximadamente 2 h.
6. Desmontar el gel y seguir a la transferencia.

9.3.4 Transferencia a la membrana de PVDF.

2. Recortar la membrana Hybond-P PVDF (AmershamBiosciences) con las dimensiones de 6 cm de ancho por 8.5 cm de largo.
3. Sumergir la membrana en metanol 100% (v/v) por 30 s,
4. Lavar la membrana con agua Mili-Q por 5 min.
5. Equilibrar la membrana con buffer de transferencia 1X mínimo 5 min antes de realizar la transferencia.
6. Colocar también en buffer de transferencia 4 piezas de papel filtro y 3 esponjas en una charola grande.
7. Remover y descartar el gel concentrador.
8. Colocar sobre el gel un filtro húmedo y despegar el gel del vidrio.
9. Colocarlo sobre la esponja del set de transferencia.
10. Armar el sándwich colocando sobre el gel la membrana previamente equilibrada. Eliminar burbujas con la pipeta.
11. Colocar un papel filtro humedecido sobre la membrana, consecutivamente colocar la esponja.
12. Transferir a 4°C a 120 V por 2 horas o a 35 V por toda la noche.

9.3.5 Western Blot

1. Después de la transferencia teñir la membrana con el reactivo rojo de Ponceau.
2. Enjuagar la membrana teñida con buffer TBS-T 1X utilizando un agitador mecánico, hasta eliminar el colorante y marcar con lápiz los pesos moleculares del marcador.
3. Sumergir la membrana en el buffer de bloqueo con leche e incubar por 1 hora de preferencia a 4°C.
4. Posteriormente lavar la membrana para eliminar restos del buffer de bloqueo.
5. Incubar la membrana con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C.
6. Retirar el anticuerpo primario y lavar la membrana 3 veces por 10 min cada vez a temperatura ambiente.



7. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario por 2 horas y en agitación de preferencia a 4°C.
8. Lavar la membrana 3 veces con buffer TBS-T 1X por 10 min cada lavado.
9. Al terminar los lavados preparar el material necesario para efectuar el desarrollo de quimioluminiscencia.

9.3.6 Quimioluminiscencia

1. Preparar la solución de detección mezclando la solución A y B del kit de quimioluminiscencia Santa Cruz Biotechnologies, en una proporción 1:1 (1 ml de cada reactivo). La cantidad requerida de la mezcla es de aproximadamente 0.1 ml /cm² de membrana.
2. Incubar la membrana con la solución en otro recipiente cubierto con aluminio. Alrededor de 1 min mezclando suavemente.
3. Colocar la membrana en un acetato y llevar a fotodocumentador.
4. Capturar la imagen.

9.4 Preparación de Reactivos

9.4.1 Geneticina

Para preparar 10 ml de geneticina, pesar 1.35 g de polvo en un tubo falcon de 15 mL, cuidando que la boca del tubo no toque ninguna superficie. Aforar con agua miliQ estéril completando a 10 ml, para obtener una concentración de 100 mg/ml. Alicuotar en tubos eppendorf y rotular. Se hace además una prueba de esterilidad dejando incubar una porción de geneticina con medio de cultivo por una semana. La geneticina recién preparada no puede ocuparse hasta que se demuestre su esterilidad.

9.4.2 Electroforesis

1. Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (Buffer separador).

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris-base	27.25 g	1.5 M
SDS	0.60 g	9.4%



Ajustar pH a 8.8 con HCl y aforar a 150 mL con agua destilada. Almacenar a 4°C.

2. Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (Buffer concentrador).

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris-base	9.0 g	0.5 M
SDS	0.60 g	0.4%

Ajustar pH a 6.8 con HCl y aforar a 150 mL con agua destilada. Almacenar a 4°C.

3. Buffer de corrida 5x.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris-base	15.1 g	125 mM
Glicina	94.0 g	1.25 M
SDS	5.0 g	0.50%

Aforar a 1 L con agua destilada hasta la completa disolución de todos los sólidos. Agitar en placa de agitación si es necesario. Puede almacenarse a temperatura ambiente.

4. Gel de Poliacrilamida de 7x10 cm por 1 mm de grosor.

Reactivo	Separador (10%)	Concentrador (5%)
Agua miliQ (ml)	4.02	3.05
Poliacrilamida al 30% (ml)	3.33	0.650
Buffer* (m)	2.5	1.25
SDS 10% (μl)	0.1	0.050
PSA 10% (μl)	0.05	0.025



TEMED (μ l)	0.01	0.010
Total	10.01 mL	8.085 mL

Buffer de pH 8.8 para el gel separador y de 6.8 para el concentrador.

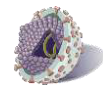
5. Buffer de desnaturalización para proteínas.

Reactivo	Cantidad (ml)
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.0
Glicerol	0.8
SDS 10%	1.6
Azul de bromofenol 1%	0.4
2-mercaptoetanol	0.4
Agua destilada	3.0

6. SDS al 10% (ICN Biomedicals, Cat. 194831): Pesar 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua destilada, agitar en placa para lograr la disolución.

7. Persulfato de amonio al 10% (Sigma, Cat. A9164): Pesar 100 mg de reactivo sólido en tubos eppendorf y guardar a -20°C protegidos de la luz. Agregar 1 mL de agua destilada justo antes de usar.

18. Inhibidor de proteasas Disolver 1 tableta de marca comercial en 1 mL de agua.



9.4.3 Western blot.

1. Buffer de transferencia 10 X.

Tris Base 25mM 60.6gr

Glicina 192mM 288gr

SDS 0.05% 10g

Agua DE2000 ml

2. TBS 10X: 24.2 g Tris HCl más 80 g NaCl disolver en 900 mL de agua destilada. Ajustar pH a 7.6 y aforar a 1 L.

3. TBS-T 1X: Diluir 100 mL de TBS 10X en 900 mL de agua destilada y adicionar 1 mL de Tween 20.

4. Buffer de bloqueo con leche 1X.

Reactivo	Cantidad
Leche descremada en polvo	1.2 g
TBS-T 1X	40 mL

5. Solución de Ponceau 0.1 % (Aforar a 200 mL con agua destilada).

Reactivo	Cantidad
Ponceau S.	0.2 g
Ac. acético	10 mL