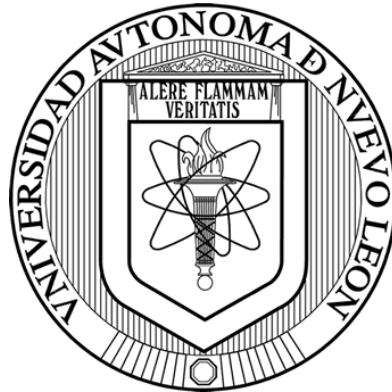




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA REGULACIÓN
NEGATIVA DEL VHC INDUCIDA POR ÁCIDO ACETILSALICÍLICO”**

PRESENTADO POR:

Q.C.B. OWEN LLOYD BRYAN MARRUGO

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN TERMINAL EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

NOVIEMBRE, 2007



RESUMEN

Departamento de Bioquímica
Facultad De Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León

Presenta: QCB Owen Lloyd Bryan Marrugo

Titulo del Estudio:

PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA REGULACIÓN NEGATIVA DEL VHC INDUCIDA POR ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

Introducción. La hepatitis C, cuyo principal agente causal es el virus de la hepatitis C (VHC), se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial afectando a más de 170 millones de personas. Existen reportes de estudios in vitro, en donde salicilatos (aspirina y salicilato de sodio) inhiben la replicación de ciertos flavivirus (virus del dengue y encefalitis japonesa), familia a la cual pertenece el VHC. Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la aspirina disminuye la replicación del VHC y los niveles de la proteína COX-2 la cual es un elemento importante en la respuesta inflamatoria. Por otro lado está reportado también que la presencia del VHC genera un estado de continuo estrés oxidativo en la célula huésped. No se conoce mediante que mecanismo el AAS reduce los niveles de RNA viral. Lo cual es de suma importancia para futuras terapias antivirales.

Objetivo. Evaluar la participación del estrés oxidativo en la regulación negativa del RNA del VHC inducida por Ac. Acetil salicílico (AAS) en células Huh7 replicón.

Materiales y Métodos. Se utilizó la línea celular de hepatocitos humanos Huh7 que expresa establemente las proteínas no estructurales del VHC y la línea celular parental (sin replicón).

Las células fueron expuestas a una concentración de 4mM de Acido acetilsalicílico y 2 uM de pirrodilin ditiocarbamato (PDTC) por 12, 24, 48 y 72 horas. Se evaluaron los niveles de ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas oxidadas (OXIBLOT), actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (Gpx). También se midieron los niveles de RNA viral por RT-PCR y niveles de Prostaglandinas por ELISA.

Resultados. Se observó que el tratamiento con 4mM de AAS y 2uM de PDTC aumentó la actividad de la SOD; disminuyó los niveles de proteínas y lípidos oxidados marcadores de estrés oxidativo y disminuyó los niveles de COX-2 y RNA viral.

Conclusiones. El AAS y el PDTC, disminuyeron los niveles de los marcadores de estrés oxidativo (proteínas oxidadas y TBARS) así como del RNA del VHC y aumentaron la actividad de la SOD.

Dra. ANA MARIA RIVAS ESTILLA
Director de Tesis

DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Co-Directora de Tesis

DRA. PAULA CORDERO PEREZ
Co-Directora de Tesis



CAPÍTULO I

INTRODUCCION

En la historia de la evolución humana, algunas enfermedades tuvieron una triste reputación por las consecuencias sociales que provocaron. La lepra, la sífilis, el cólera y la tuberculosis hicieron eclosión en diversos períodos de la historia. Aún hoy se mantienen vigentes, en espera de las condiciones propicias para entrar nuevamente en escena. En la actualidad, el SIDA es, sin duda, la enfermedad que ocupa la atención del público, de los investigadores y de los médicos. Sin embargo, existe otra entidad infecciosa que, sin tener tanta publicidad, merece igual o más atención que las mencionadas. Se trata de la **Hepatitis C**.

La globalización y la explosión tecnológica e industrial han traído como consecuencia que enfermedades como la hepatitis C encuentren la manera de propagarse a través del globo.

1.1 HEPATITIS

En términos generales significa inflamación del hígado; como consecuencia de ésta se bloquea el paso de la bilis que produce el hígado al descomponer la grasa, y se altera la función del hígado de eliminar las toxinas de la sangre, de producir diversas sustancias importantes y de almacenar y distribuir la glucosa, vitaminas y minerales. Puede presentarse en forma aguda (si dura menos de seis meses), en forma crónica (si persiste más de seis meses), o fulminante (si pone en riesgo la vida del enfermo)¹.

Puede deberse a infecciones virales, bacterianas o parasitarias; por acción del alcohol o fármacos, por toxinas o por enfermedades autoinmunes. Los virus que más frecuentemente inflaman al hígado son el virus de la hepatitis A, B, C, D y E³.

1.1.1 Hepatitis A: se transmite por una mala higiene o por agua y alimentos contaminados. La hepatitis A en general tiene un curso benigno hasta la recuperación completa³.



1.1.2 Hepatitis B: se transmite por sangre, tiene de 2 a 4 meses de incubación; muchas personas no tienen síntomas o estos son muy leves. El curso de la enfermedad puede ser largo y llegar a complicarse con una enfermedad más seria. La hepatitis B no es altamente contagiosa y puede ser transmitida por transfusión de sangre infectada, por el uso de agujas o instrumentos no o a través del contacto sexual. Las personas sometidas a diálisis renal tienen mayor riesgo de contraer hepatitis B³.

1.1.3 Hepatitis C: es la causal de la mayoría de las hepatitis que se contagian por transfusión de sangre. Se transmite por jeringas contaminadas. Este virus causa hepatitis crónica y con menor frecuencia, cirrosis y cáncer hepático. Existen personas sanas portadoras crónicas del virus C. El período de incubación va de 6 semanas a 6 meses⁴.

1.1.4 Hepatitis D: se manifiesta como complicación o sobre infección del virus B. Hepatitis E: tiene similitudes con el virus A y, como éste, puede causar epidemias. Los síntomas más comunes son: inapetencia, malestar general y decaimiento, vómitos, dolor e indigestión abdominal, fiebre, alteración del sentido del gusto, orina oscura, pigmentación amarilla en la piel, mucosas y del globo ocular³.

1.1.5 Hepatitis E. Causada por el virus de la Hepatitis E, se disemina a través de agua contaminada.

En este trabajo ocupará nuestra atención la enfermedad hoy conocida como **Hepatitis C**.

1.2 HISTORIA DE LA HEPATITIS C

El cuadro clínico que hoy conocemos como Hepatitis asociada a transmisión parenteral se reconoció hace más de 100 años; sin embargo la primera descripción de Hepatitis post transfusional fue hecha por Benson en 1943⁵.

En la década de los 70 se identificaron los virus de la Hepatitis A y B. Sin embargo quedaba claro que no todos los casos de Hepatitis post transfusional



eran debido a estos virus ya que al estandarizar métodos de análisis clínicos para el perfil de donador, incluyendo detección serológica para hepatitis A y B, se observó que hasta un 10% de las personas que recibían transfusiones sanguíneas en los Estados Unidos desarrollaban hepatitis. Se llamo hepatitis no A- no B a este cuadro clínico de origen desconocido⁶.

Para comprobar la naturaleza infectiva de la así llamada hepatitis no A - no B, investigadores inocularon chimpancés con suero de pacientes seronegativos para hepatitis A y B los cuales presentaban el cuadro clínico característico. De 1 a 3 meses después de la inoculación los chimpancés desarrollaron el cuadro clínico de la hepatitis post transfusional que también habían presentado los pacientes de los cuales se extrajo el suero, comprobando así que la hepatitis no A-no B era causada por un agente infeccioso⁶.

En la década de los 80 Bradley y col. Descubrieron que el agente infeccioso responsable de la hepatitis no A-no B era un virus, y que este constaba de una capa lipídica ya que era inactivado al exponerse al cloroformo.

En 1989, luego de una década de haberse sugerido la existencia del virus de la Hepatitis no A – no B, se logro identificar y caracterizar el mismo gracias al uso de la biología molecular e ingeniería genética.

En 1995 pudo visualizarse por primera vez la partícula viral del VHC por medio de la microscopia electrónica⁴.

El esclarecimiento del genoma del virus de la hepatitis C implicó que se adquiriera conciencia de que este virus es un grave problema de salud en todo el mundo, además de saberse que la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una de las causa más frecuentes de hepatopatía crónica.

Muchos estudios se han realizado en torno a la epidemiología de la enfermedad, factores de riesgo, mecanismos de patogenicidad del virus, etc. ; sin embargo el hecho de que aun no sea posible replicar el virus *in vitro*, la falta de un modelo animal viable y más aun la alta tasa de mutación del virus han dificultado el encontrar un tratamiento más efectivo y el encontrar una vacuna.

1.3 EPIDEMIOLOGIA D ELA HEPATITIS C

1.3.1 Prevalencia Mundial

De acuerdo a datos entregados por la Organización Mundial de la Salud, en el mundo hay 170 millones de personas infectadas con este virus (fig.1), siendo 5 veces más frecuente que la infección por el VIH-1².

Hepatitis C - Global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec* 1999; 74: 425-7

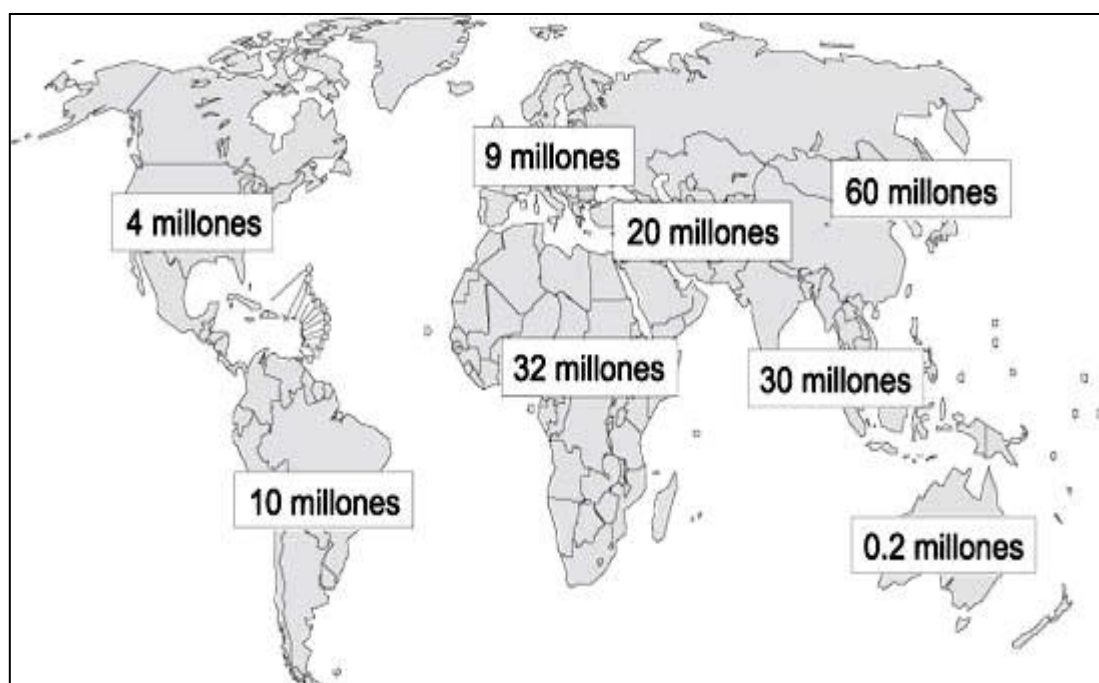


Figura 1. Distribución Mundial de la Hepatitis C

Desde que hace 18 años se descubriera este virus, el tratamiento para paliar sus efectos ha mejorado notablemente y triplicado las tasas de curación en la última década. Pero aún es mucho lo que se desconoce del VHC, empezando por el factor concreto que desencadena la enfermedad y acabando por la vacuna que logrará prevenirla.

La hepatitis C es un problema de salud pública de notable relevancia, más por el hecho de estar muy infradiagnosticada y por la ausencia de vacuna para prevenirla. Aunque cuenta con un tratamiento relativamente eficaz, cada año se unen a este colectivo de pacientes enfermos entre 3 y 4 millones de casos. Su



distribución a lo largo del planeta es desigual (cuadro 1) y varía en función, principalmente, del nivel socioeconómico, que marca los hábitos de vida — elementos clave en el contagio de la enfermedad— y explica por qué en las zonas menos desarrolladas el porcentaje de infecciones no diagnosticadas sea muy elevado⁶.

Regiones de la OMS	Población total (millones)	Prevalencia de Hepatitis C	Población infectada millones	Número de países de los que no hay datos
África	602	5,3	31,9	12
América	785	1,7	13,1	7
Mediterráneo Este	466	4,6	21,3	7
Europa	858	1,03	8,9	19
Sudeste Asia	1.500	2,15	32,3	3
Pacífico Oeste	1.600	3,9	62,2	11
Total	5.811	3,1	169,7	57

Fuente: Weekly Epidemiological Record (OMS)

Cuadro 1. Prevalencia Mundial de la Hepatitis C

De no abaratare los esquemas de tratamiento, para el año 2008 la tasa de incidencia de la enfermedad aumentará en un 500%. El tratamiento hoy cuesta entre \$ 5,000 a \$ 10,000 pesos por mes.

El carácter frecuentemente asintomático de la enfermedad hace también que en la mayoría de los casos su diagnóstico se produzca de manera casual, cuando, al efectuar un estudio rutinario de salud o en el seno del estudio de otra patología, se realizan estudios que revelan tasas muy altas de transaminasas. Los síntomas pueden darse en alrededor de la mitad de las infecciones, pero, aunque algunos, como la ictericia, la orina oscura, el excremento pálido, las cefaleas o las náuseas, son fáciles de interpretar, otros, tales como el cansancio, el dolor abdominal y/o muscular y el estreñimiento o diarrea, son bastante inespecíficos.

Existen variaciones geográficas importantes, se identifican tres patrones epidemiológicos: el primero muestra que la prevalencia por edad es baja en los menores de 20 años, se incrementa en forma importante en las siguientes décadas, alcanza su pico mayor de los 30 a 49 años y disminuye en los mayores de 50 años, este patrón corresponde al observado en Estados Unidos y Australia. En el segundo modelo la prevalencia es baja en los grupos de menor edad y jóvenes, concentrándose el mayor porcentaje de infectados en los adultos mayores; esto es lo observado en Italia y Japón. El tercer patrón epidemiológico se caracteriza por un incremento sostenido conforme la edad aumenta, con una alta prevalencia en todos los grupos de edad; este tipo de patrón se observa en países como Egipto³.

Las principales vías de transmisión a nivel mundial son la transfusión de sangre infectada y el uso de drogas intravenosas; sin embargo, en 30-50% de los casos no es posible reconocer un factor de riesgo, por lo que se han postulado otras vías potenciales de adquisición de la infección las cuales incluyen hemodiálisis, contacto sexual, tatuajes, perforaciones corporales, exposición ocupacional, transmisión materno-fetal, contacto intrafamiliar e inhalación de cocaína⁴.

1.3.2 Prevalencia de la Hepatitis C en México

La hepatitis C afecta aproximadamente a un 0.7% de la población mexicana y se estima que existe un porcentaje importante de casos sin detectar.

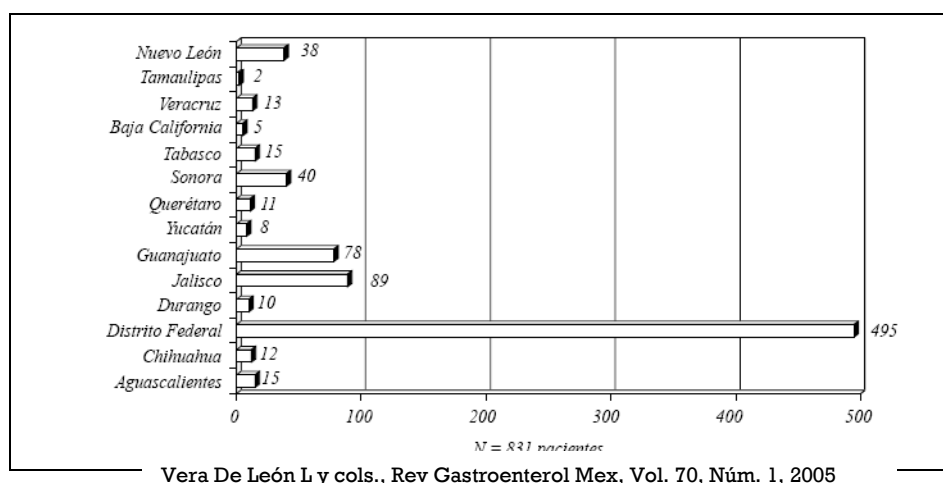


Figura 2. Distribución de casos reportados de Hepatitis C en México



En México no existen estudios epidemiológicos completos, sin embargo los datos que tenemos hasta la fecha muestran el mayor número de pacientes VHC positivos en el Distrito Federal (fig.2), seguido de estados del centro y norte del país. En este estudio, realizado por Vera de León y cols. en 2005 se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La principal vía de transmisión fue la transfusión de sangre y sus derivados. Sin embargo, después de 1995 disminuye en forma significativa (4.5%) muy probablemente en relación con introducción de las pruebas de escrutinio en los bancos de sangre.
2. El tiempo promedio de la transfusión al diagnóstico es similar a lo reportado en la literatura mundial (23 años para hepatitis crónica y 26 años para cirrosis hepática).
3. El uso de drogas IV tiende a ser una vía de transmisión con tendencia importante para la infección por virus C en la frontera norte y grandes ciudades del país.
4. El genotipo predominante en nuestro país es el 1.
5. El mayor porcentaje de estos pacientes diagnosticados con infección por virus "C" recibe tratamiento, siendo el más utilizado en la actualidad la combinación de interferón $\alpha 2a$ más ribavirina.
6. El 50% de los pacientes con cirrosis hepática cursan con complicaciones tardías y en especial aquellos nunca tratados ($p < 0.0001$).

1.4 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

Las dificultades inherentes a definir la historia natural de la Hepatitis C son varias; en primer lugar para realizar estudios de este tipo es necesario conocer el momento en que los pacientes son contagiados para así establecer frecuencia y tasa de progresión. Desafortunadamente más del 80% de los pacientes con hepatitis C crónica, no recuerdan haber presentado algún síntoma relacionado con la hepatitis C, esto aunado al lento progreso de la enfermedad, hacen casi imposible un seguimiento fidedigno de la misma.

Hepatitis C - Global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec* 1999; 74: 425-7

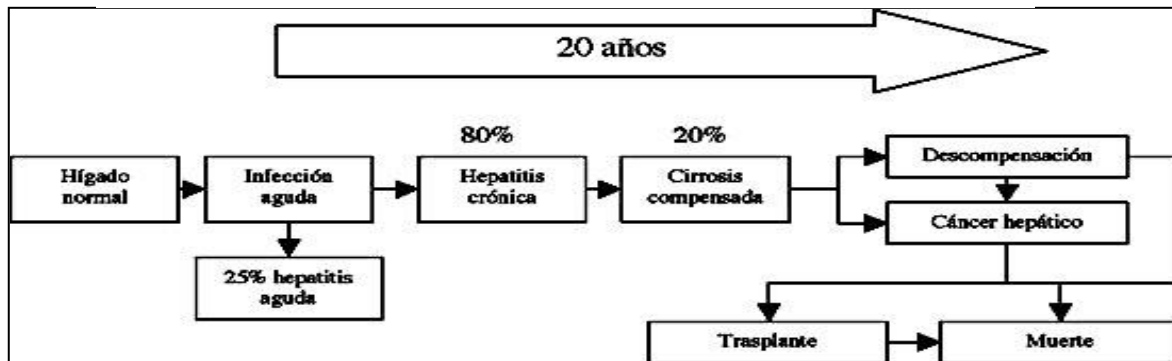


Figura 3. Esquema de la Historia Natural de la Hepatitis C

La particular historia natural de esta enfermedad, con un período de latencia de décadas entre el momento de la infección y las manifestaciones más importantes (cirrosis y cáncer hepático) hacen necesario apreciar en forma diferente las cifras de incidencia y prevalencia de la enfermedad (fig.3).

El contagio se da por exposición con sangre infectada, a saber:

- Uso y abuso de drogas
- Transfusiones de sangre
- Trasplante de órganos de pacientes infectados
- Mala práctica medica
- Exposición ocupacional
- De la madre niño
- El tener múltiples parejas sexuales

En aproximadamente 40% de los casos se desconoce el medio de transmisión².

La exposición al VHC conlleva a la infección aguda. Entre 20 y 30% de estos pacientes presentaran síntomas, entre los que se encuentran:

1.4.1 Signos y Síntomas

- *Ictericia (coloración amarilla de la piel)
- *Coluria (presencia de pigmento biliar en la orina)
- *Nausea, vómito
- *Pérdida del apetito
- *Fiebre, escalofríos
- *Malestar general
- *Heces con color de arcilla
- *Diarrea
- *Fatiga
- *Dolor de cabeza
- *Prurito
- *Hepatomegalia (agrandamiento del hígado)
- *Dolor abdominal

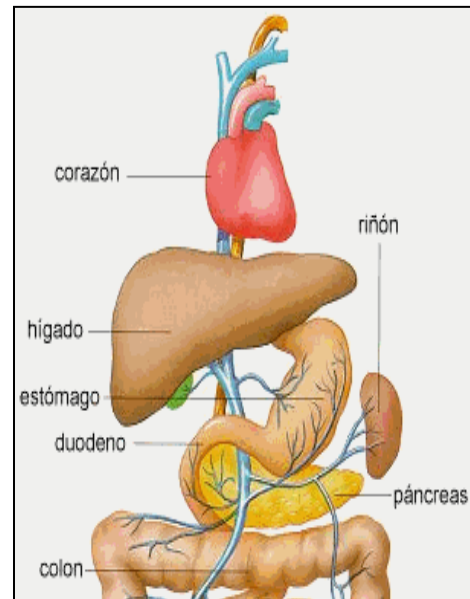
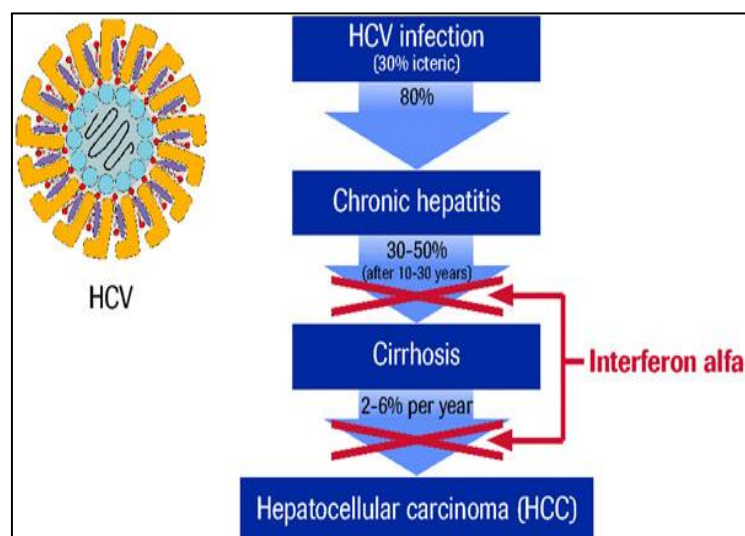


Figura 4

Dos a tres semanas después de la exposición inicial se detectan el RNA viral en el suero de los pacientes. Los anticuerpos anti-VHC aparecen en 50 a 70% de los casos al presentarse los síntomas y se incrementa el porcentaje hasta un 90% dentro de los próximos 3 meses⁴.

Figura 5

Dentro de un promedio de 2 a 8 semanas aparecen las primeras señales de daño hepático con una elevación en los niveles de alanina aminotransferasa. La infección aguda puede llegar a ser severa pero rara vez fulminante pudiendo desarrollarse de manera subclínica.





Una de las características distintivas de la infección por VHC es la cronicidad. De la totalidad de pacientes infectados de un 70 – 85 % desarrollan una infección crónica (fig. 5), la cual se diagnostica mediante la detección del RNA viral en suero por más de 6 meses después de la infección primaria⁵.

El mecanismo de daño hepático por parte del VHC no está claramente definido aún, sin embargo poca es la evidencia de que el virus sea citopatogénico por si mismo, por lo tanto se presume que el daño celular es mayormente causado por respuesta inmune del huésped, misma que en la mayoría de los casos, no es capaz de eliminar la infección lo cual mantiene un estado infección persistente y daño hepático continuo. Entre las secuelas más significativas de la infección crónica están la esteatosis, fibrosis hepática progresiva la cual conlleva a cirrosis hepática y en muchos casos una evolución a carcinoma hepatocelular.

1.4.2 FACTORES DE RIESGO

Existe evidencia de que los factores virológicos tienen muy poco que ver con la persistencia de la infección, estos incluyen carga viral, genotipo, diversidad de quasiespecies, etc. Entre las cuales no se ha encontrado diferencia significativa en cuanto al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo existen ciertos factores del huésped que incrementan el riesgo a desarrollar infección crónica. Entre ellos se encuentran ser del sexo masculino, raza afro-americana, presentar un estado de inmunosupresión, la ingesta de alcohol entre otros⁷.

1.5 TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C

El interferón alfa pegilado (fig.6), junto con ribavirina son el tratamiento de elección. Esta terapia es eficientes en hasta 5 de cada 10 pacientes (50%) cuando se trata del VHC genotipo 1 y hasta en 8 de 10 (80%) cuando la infección es causada por VHC genotipo 2.

Muy poco ha logrado avanzarse en cuanto al desarrollo de una vacuna efectiva contra el VHC debido a la alta tasa de mutación del virus y al hecho de que no ha sido posible, hasta la fecha, implementar un modelo in vivo en el que

Figura 6

Jay H. Hoofnagle, M.D., and Leonard B. Seeff, M.D., Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C, *The new england journal of medicine*, december 7, 2006

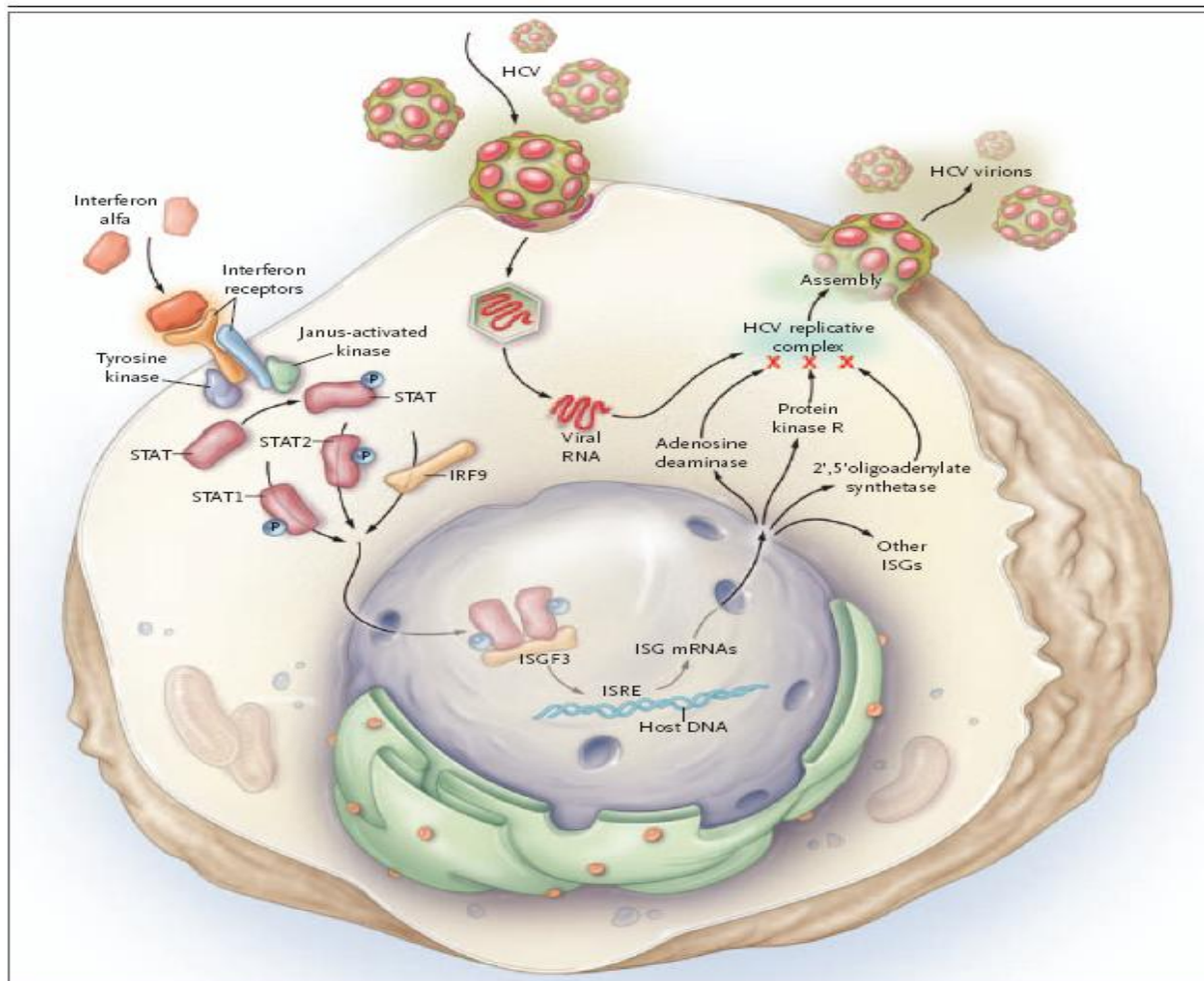


Fig. 6. Mecanismos de acción del interferón. La unión del interferón alfa IFN- α a su receptor, causa la trimerización de las sub-unidades del mismo. Esto activa las enzimas citosólicas Tyk2 y JAK1 que se autofosforilan entre si en su residuo tirosina, y fosforilan a la subunidad INFR2c del receptor. Esta enzima se une a la subunidad INFR1 fosforilada, y es fosforilada por Tyk2 y JAK1. A su vez STAT-2 fosforilada, cataliza la fosforilación del factor regulador de interferón 9 (IRF-9). Este complejo es trasladado al núcleo donde se une al ADN para inducir la expresión de genes antivirales. El IFN induce la expresión de mas de 100 genes.

se pueda replicar eficientemente el virus ni tampoco se ha podido establecer un modelo de cultivo in vitro³².

El modelo más utilizado para estudiar el VHC es el modelo de replicones subgenómicos, el cual será descrito más adelante.

1.6 VIRUS DE LA HEPATITIS C

1.6.1 EL VIRUS

El VHC posee muy poco en común con los virus de la hepatitis A y B, que son mejor conocidos, pertenece a la familia flaviviridae que comprende virus como los de la fiebre amarilla y el dengue. La partícula viral consta de una cubierta lipídica derivada de las membranas del huésped y que rodea la nucleocápside. Dentro de la nucleocápside se encuentra un genoma ARN monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 9.6 Kb. El genoma codifica para una poliproteína de aproximadamente 3,000 aminoácidos la cual es luego procesada por proteasas del virus y del huésped para dar lugar a las proteínas maduras encargadas de la replicación y transcripción viral¹⁴(fig 7).

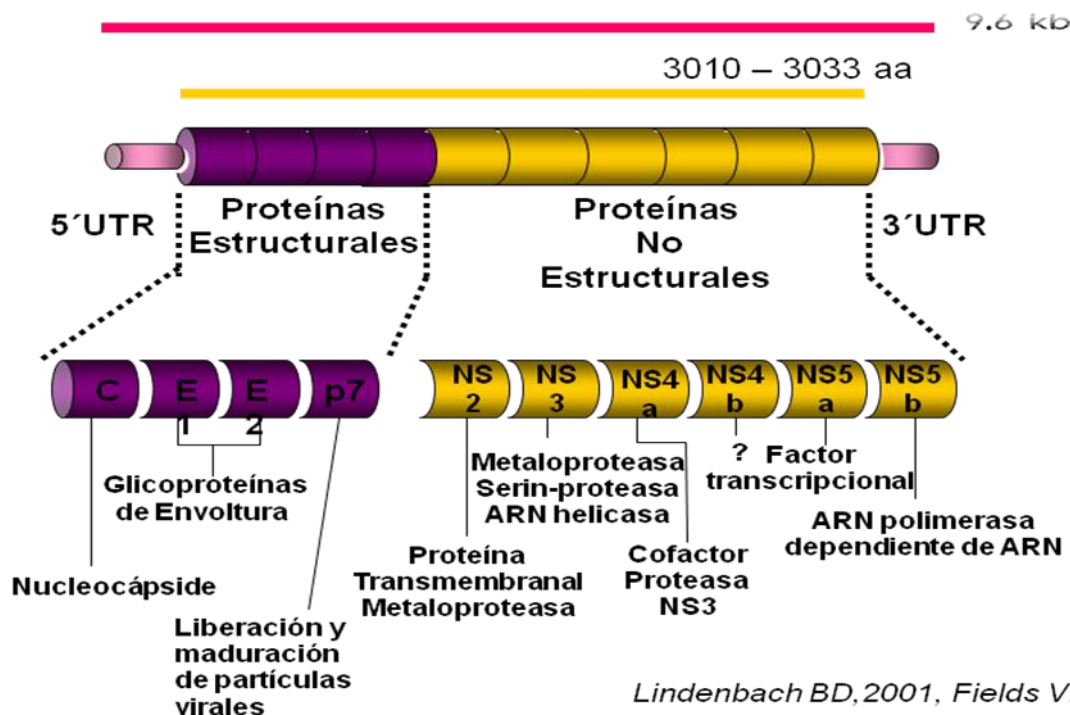


Figura 7. Representación estructural del VHC

Como otros virus de ARN, el VHC circula en el paciente en forma de quasiespecies como resultado de mutaciones que ocurren durante la replicación, lo que probablemente le permite escapar a los mecanismos de respuesta inmunológica y al tratamiento con agentes antivirales. La heterogeneidad genética no está igualmente distribuida a lo largo del genoma, siendo los genes

que codifican para las proteínas E1 y E2 los más heterogéneos. El VHC se ha clasificado en 6 genotipos y más de 100 subtipos, basados en análisis filogenéticos. Estos genotipos difieren hasta en un 30 – 50 % en su secuencia nucleotídica. Los genotipos 1 – 3 están distribuidos alrededor del mundo; los genotipos 4 y 5 se encuentran mayormente en África y el genotipo 6 está confinado a las regiones asiáticas. En México, el genotipo más común es el 1 el cual se asocia a una pobre respuesta al tratamiento¹⁵.

1.7 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD VIRAL

Uno de tantos modelos, que por medio de la experimentación han sido deducidos y se han propuesto para representar y explicar de qué manera el VHC interviene en el metabolismo celular y crea un estado de infección continuo, sitúa al virus en las cercanías del retículo endoplásmico (RE). La replicación del VHC está asociada al RE, organelo encargado de la modificación y maduración de proteínas. La expresión de los genes virales provoca que haya más proteínas inmaduras las cuales incrementan la carga proteica en el RE causando una excesiva acumulación de proteína no plegadas o mal plegadas en el mismo.

TRENDS in Microbiology Vol.13 No.4 April 2005

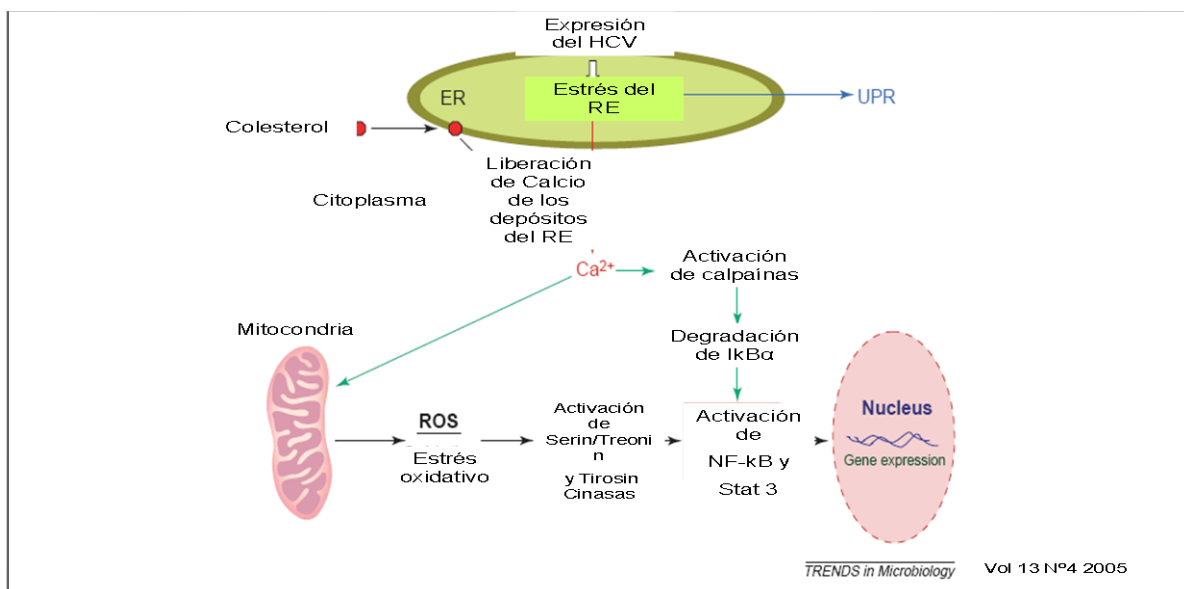


Figura 8. Mecanismo de patogenicidad del VHC

La célula para aliviar esta carga, dispara lo que conocemos como UPR (por sus siglas en inglés Unfolded Protein Response), Respuesta de Proteínas No



Plegadas (fig.8), el cual es un mecanismo adaptativo destinado a aliviar la carga proteica en el RE y que consiste en la inhibición de la transcripción de ciertos genes (genes de metabolismo normal) y la expresión de otros (genes para chaperonas). De esta manera se reduce la síntesis de proteínas y se aumenta el ritmo de plegamiento y modificación de las ya existentes²².

Además de la UPR, existen otros mecanismos que se ven alterados por la expresión viral. La acumulación de proteínas en el RE provoca la liberación de calcio de los depósitos que se encuentran en el mismo, el calcio liberado es captado por la mitocondria en donde promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROs). Las ROs además de ser muy tóxicas por su alta reactividad, también ejercen influencia en diversas vías de señalización las cuales activan factores de transcripción que causan la expresión de genes blanco involucrados en respuesta inflamatoria, apoptosis, ciclo celular y múltiples aspectos del metabolismo (fig.8).

1.8 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENOS (RO's)

Los RO's son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón(e-) desapareado con capacidad de aparearse, por lo que son muy reactivos. Son productos naturales derivados del metabolismo del oxígeno. Entre los más conocidos tenemos:

- Radical Anión Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Radical hidroxilo ($\cdot OH$)

Los RO's existen normalmente en todas las células que utilizan la respiración aeróbica como medio para transferir energía y su concentración se encuentra controlada por mecanismos antioxidantes naturales.

El estado de estrés oxidativo se da al romper el balance que hay entre los niveles de RO's y la capacidad de la célula para eliminar estas RO's.

El estrés oxidativo ha sido involucrado en diversas enfermedades como el cáncer, las enfermedades degenerativas neurológicas -enfermedad de



Parkinson, demencia de Alzheimer, la diabetes, el reumatismo, enfermedades cardiovasculares como el infarto miocárdico y cerebral, etc. (Halliwell y Gutteridge, 1985; Floyd, 1990; Ebadi y cols., 1995) Esta lista, a la que podemos agregar el envejecimiento normal y patológico, es un indicador de la importancia clínica que el estrés oxidativo tiene para una amplia gama de patologías de muy alta prevalencia²³.

En la infección por VHC, así como en muchas otras infecciones virales, los niveles de RO's aumentan debido, entre otras cosas, al aumento de carga funcional causado por la presencia del virus, cuyo objetivo es utilizar la maquinaria celular para crear un progenie. Este aumento ha sido hasta de 5 veces más en ensayos in vitro en donde se comparan células transfectadas establemente con el replicón subgenómico del VHC contra células de la misma línea celular, las cuales no poseen el virus. Este aumento crea un desbalance y el efecto del mismo repercute en múltiples elementos celulares:

- Peroxidación lipídica
- Oxidación de proteínas
- Daño al ADN

En conjunto todas estas alteraciones tienen un efecto negativo en el metabolismo celular. Las modificaciones en las proteínas y los lípidos, por causa de las RO's provocan cambios que interfieren con actividad enzimática, reconocimiento de receptores, respuesta inmunológica e inflamatoria, agregación plaquetaria, etc²⁸.

1.9 ACIDO ACETILSALICILICO

En estudios anteriores se constato que el Acido acetilsalicílico (AAS) presenta un efecto negativo sobre la replicación de ciertos Flavivirus, incluidos entre ellos el virus del Dengue y el virus de la Encefalitis Japonesa. El VHC, como mencionamos anteriormente, pertenece a esta familia y en trabajos realizados en el Laboratorio de Infectología Molecular, dentro de esta misma línea de investigación (Trujillo-Murillo, 2007 JVH), se ha reportado que el AAS presenta, también, una regulación negativa sobre los niveles de RNA viral en células



tratadas con respecto a las no tratadas. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos tan interesantes, no está bien definido mediante que mecanismo (s) el AAS media esta regulación²⁴.

El ácido acetilsalicílico, mejor conocido como aspirina es un fármaco obtenido de la corteza del sauce (*Salix alba*). Era utilizado en la antigüedad por culturas como la griega y los pueblos indígenas americanos. Fue sintetizada por el químico alemán Félix Hoffman en 1893. Su formulación química está dada por: **(C₉H₈O₄)**.

Al AAS se le atribuyen propiedades analgésicas, antitrombóticas, antipiréticas, antiinflamatorias, entre otras. Sus efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios se deben a las asociaciones de las porciones acetilo y salicilato de la molécula intacta, como también a la acción del metabolito activo salicilato. El efecto antiagregante plaquetario se debe a su capacidad como donante del grupo acetilo a la membrana plaquetaria y a la inhibición irreversible de la enzima Ciclooxygenasa. Inhibe la actividad de la enzima Ciclooxygenasa al acetilar su residuo de Serina 530, lo que disminuye la formación de precursores de las prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Aunque la mayoría de sus efectos terapéuticos pueden deberse a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en diferentes tejidos, hay otras acciones que también contribuyen. La absorción es rápida y completa tras la administración oral; los alimentos disminuyen la velocidad pero no el grado de absorción. Su unión a las proteínas (albúmina) es alta, pero decrece según aumenta la concentración plasmática, con concentraciones bajas de albúmina, en la disfunción renal y durante el embarazo. La vida media es de 15 a 20 minutos (para la molécula intacta) ya que se hidroliza rápidamente a salicilato. La concentración plasmática terapéutica como analgésico y antipirético es de 2,5 a 5mg por 100ml, que se alcanzan generalmente con dosis únicas. Como antiinflamatorio/antirreumático de 15 a 30mg por 100ml, si bien para lograr el efecto máximo como antirreumático pueden necesitarse 2 a 3 semanas de tratamiento continuo. Se elimina por vía renal como ácido salicílico libre y como metabolitos conjugados. La excreción de ácido salicílico no metabolizado aumenta con dosis elevadas y en la orina alcalina, y disminuye en la orina ácida. Se excreta también en la leche materna, observándose que tras la ingestión de



una dosis única de 650mg se han detectado concentraciones máximas de salicilato de 173 a 483ug/ml³⁰.

1.9.1 REACCIONES ADVERSAS

Náuseas, vómitos, diarrea, epigastralgia, gastritis, exacerbación de úlcera péptica, hemorragia gástrica, comezón, urticaria, petequias, mareos, acufenos. El uso prolongado y en dosis excesivas puede predisponer a la nefrotoxicidad. Puede inducir broncoespasmo en pacientes con asma, alergias y pólipos nasales.

1.9.2 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Pacientes con antecedentes de úlcera péptica, gastritis o anormalidades de la coagulación. Niños y adolescentes con enfermedad febril viral (específicamente varicela) debido al riesgo de aparición de síndrome de Reye, enfermedad muy rara y con frecuencia mortal que afecta al cerebro y a algunos órganos abdominales. Pacientes embarazadas; en el último trimestre puede prolongar el trabajo de parto y contribuir al sangrado materno y fetal. Pacientes asmáticos, ya que puede precipitar una crisis. Los pacientes geriátricos suelen ser más sensibles a los efectos tóxicos, posiblemente debido a una menor función renal, por lo que pueden requerirse dosis menores, sobre todo en el uso a largo plazo.

1.9.3 CONTRAINDICACIONES

Hipersensibilidad a la aspirina, úlcera péptica, hipoprotrombinemia, hemofilia, Insuficiencia renal crónica avanzada. Deberá evaluarse la relación riesgo-beneficio en pacientes con anemia, asma, alergias, gota, tirotoxicosis, ya que pueden exacerbarse con dosis elevadas.

El AAS es un AINES, antiinflamatorio no esteroideo de la familia de los salicilatos y utilizado ampliamente a nivel mundial.

Su principal efecto es antiinflamatorio y lo lleva a cabo mediante la inhibición de la enzima Ciclooxygenasa 2.

Mientras que la mayoría de los AINES son inhibidores competitivos y reversibles de la COX-2, el AAS es un inhibidor irreversible, ya que acetila a la



COX-2 en su sitio activo, específicamente acetila el residuo de Serina 530, aboliendo así la actividad enzimática.

Las prostaglandinas son potentes mediadores de la inflamación. El primer paso de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico es una dioxigenación del araquidonato que da lugar a PGG₂, seguida de una reacción de reducción a PGH₂. Ambas reacciones son catalizadas por la enzima Ciclooxigenasa (COX), también conocida como Prostaglandina G/H sintetasa, que aparece en la membrana como un dímero²⁸.

Existen dos isoformas de COX en animales: COX-1 que mantiene una producción fisiológica normal de prostaglandinas, y COX-2, que es inducida por citoquinas, mitógenos y endotoxinas en células inflamatorias, y que es la responsable de la producción de prostaglandinas en el proceso inflamatorio. Las dos formas guardan un alto grado de homología entre ellas, como se puede comprobar al observar el resultado de un alineamiento múltiple de secuencias.

En la actualidad se ha descrito una tercera isoforma que es codificada por el mismo gen de la COX-1 pero que difiere en la retención de un intrón.

La expresión de la COX-2 se ha relacionado directamente con la presencia del VHC. En estudios in vitro se reporta que existe una relación directa entre los niveles de COX-2 y de RNA viral, es decir que la presencia del virus aumenta los niveles de COX-2 y viceversa.

Es probable que en este punto se esté dando la acción del AAS, que al inhibir a COX-2, regule negativamente los niveles de RNA del VHC.

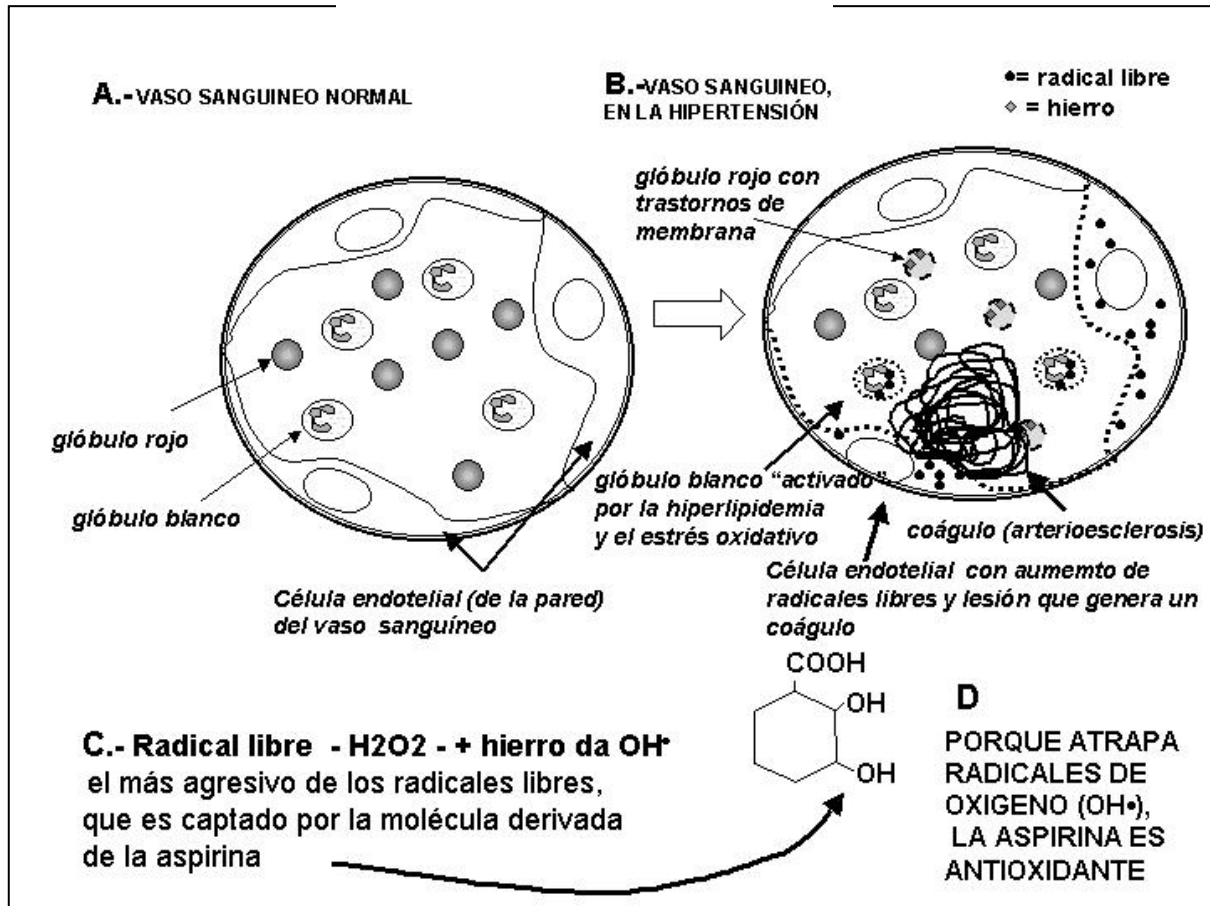
1.9.4 EL AAS COMO ANTIOXIDANTE

Una dosis diaria de 100 miligramos de aspirina aumenta la capacidad antioxidante del organismo y reduce las posibilidades de envejecimiento de las arterias, según las conclusiones primarias de una investigación de científicos uruguayos, liderados por Federico Dajas, jefe del Departamento de Neuroquímica del Instituto Clemente Estable²⁶. En este trabajo se estudiaron

alrededor de 200 pacientes, obteniendo resultados que sitúan al ASS como un antioxidante.

Figura 9. La Aspirina como Antioxidante

Noticia publicada en El Observador el 30 de mayo de 2001



Estudiando la estructura del AAS puede observarse que este al entrar al organismo es rápidamente solubilizado a salicilato el cual es capaz de atrapar radicales hidroxilo, de esta manera ejerce su propiedad antioxidante, misma que podría estar involucrada en su efecto antiviral sobre el VHC (fig. 9).

1.10 PYRROLIDINE DITHIOCARBAMATO (PDTC)

El PDTC es un conocido antioxidante frecuentemente utilizado para estudiar el rol de las especies reactivas de oxígeno en procesos biológicos.

Los dithiocarbamatos son antioxidantes los cuales son potentes inhibidores de el factor NF-kB. Al PDTC también se le han atribuido propiedades antivirales³³.

CAPÍTULO II



JUSTIFICACIÓN

La infección por VHC es un importante problema de salud a nivel mundial. Afecta aproximadamente a 170 millones de personas y de 3 a 4 millones se contagian cada año. En México y alrededor del mundo se sitúa como la primera causa de trasplante hepático, significando un gasto económico-social considerable.

La terapia utilizada actualmente para combatir la Hepatitis C, es eficiente en alrededor del 50% de los casos³².

Se ha asociado la presencia del VHC con el aumento del estrés oxidativo (RO's) en células hepáticas y se conoce que este estado favorece la replicación viral y la persistencia de la infección.

Resultados preliminares de nuestro Laboratorio, nos indican que el AAS tiene un efecto regulador negativo sobre los niveles de RNA viral en células que expresan proteínas no estructurales del VHC. Sin embargo, no se conoce mediante que mecanismo (s) el AAS reduce los niveles del RNA del VHC.

El comprender mejor esta vía permitirá conocer los mecanismos de patogenicidad del virus y proponer nuevos blancos terapéuticos para implementar un mejor y más efectivo tratamiento antiviral.



CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del estrés oxidativo en la regulación negativa del RNA del VHC inducida por Acido Acetilsalicílico (AAS) empleando el modelo de replicones subgenómicos del VHC.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar los niveles basales de estrés oxidativo en las líneas celulares Huh-7 (parentales y replicón) en presencia o ausencia de las proteínas no estructurales del VHC.
2. Conocer si el tratamiento con AAS modifica los niveles de estrés oxidativo presentes en células Huh-7 parentales y replicón.
3. Determinar el efecto de un antioxidante en los niveles de expresión del RNA-VHC en células Huh-7 que expresan proteínas no estructurales de VHC.
4. 4. Correlacionar los niveles de estrés oxidativo, en células Huh-7 replicón tratadas con AAS y un antioxidante, con los niveles del RNA y proteínas virales.



CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA FÍSICA

Este trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

4.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO DE LABORATORIO

4.2.1 MATERIALES Y EQUIPO

- Campana de flujo laminar clase II, tipo A2, marca Nuair.
- Incubadora de CO₂ marca Nuair.
- Centrifuga Centra CL2, Marca Termo Electron Corporation.
- Tubos falcón de 15 y 50 ml, botellas de cultivo de 75 cm², placas de cultivo de 35mm y 100mm x 10mm, raspadores de células (scrappers), pipetas desechables de 5 y 10 ml marca Corning (Corning, NY, USA).
- Tubos de ensayo de vidrio de 7cm
- Pipetas semiautomáticas de 10, 20, 100, 200 y 1000 µL.
- Cámara de electroforesis vertical Mini-Protean 3 Cell, BIO-RAD (Hercules, CA, USA).
- EpiChem Dark room marca UVP BioImaging Systems (Upland, CA, USA).
- Gyrotwister, marca LABNET.
- Centrífuga refrigerada marca Heraeus (Osterode, Germany).
- Biofotometr, marca Eppendorf (Hamburg, Germany).
- Termociclador de Gradiente marca Eppendorf (Hamburg, Germany).
- ABI PRISM 7000, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).
- Microondas, marca Panasonic.
- Cámara de electroforesis horizontal marca OWL.
- Fotodocumentador modelo GELDOC 1000, marca BIO-RAD (Hercules, CA, USA).



- Lector de microplaca, modelo ELx800, marca Biotek.
- Lector de Elisa Multiskan Explus, marca Lab Systems

4.3 REACTIVOS

- Para el mantenimiento de las líneas celulares se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), DMEM advanced, L-Glutamina (200 mM; 100x), Tripsina-EDTA (1x), Suero Bovino Fetal (SBF) 10 y 2%; Penicilina (100 UI/ml) y Estreptomicina (100 µg/ml); aminoácidos no esenciales (10nM) y Geneticina, sulfato G-418 marca GIBCO-BRL (Grand Island, N.Y., USA).
- Para la evaluación del estrés oxidativo se utilizaron los estuches comerciales TBARS assay de Oxytek (Zeptomatrix), cat: 0801192 y el estuche comercial, Oxiblot marca Chemicon International, cat: S7150.
- Para la evaluación de las enzimas antioxidantes celulares se utilizaron los estuches comerciales de Superóxido Dismutasa assay marca Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), cat: 706002 y Glutación Peroxidasa assay, marca Oxytek, Zeptomatrix, cat: 805002.
- Reactivo ECL Plus Western Blotting marca Amersham Biosciences, cat: RPN 132 y RPN 133; para la medición de fluorescencia.
- Para los ensayos de viabilidad celular se utilizó el colorante azul tripano al 0.4% de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA)
- Para la extracción de RNA total a partir de células en monocapa se utilizó TRIZOL de la marca INVITROGEN (Carlsbad, CA, USA).
- Para los ensayos de WESTERN BLOT se utilizó el buffer HEPES, pH 7.2 con EGTA 1mM, Manitol 210 mM y 70 mM de Sucrosa. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford reactivo de la marca BIO-RAD (Hercules, CA, USA) y se construyó una curva estándar utilizando albumina sérica Bovina de la marca Amresco.
 - Para la preparación de los geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida y bis-acrilamida de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA).
 - El marcador de peso molecular fue de PROMEGA (Madison, WI, USA).



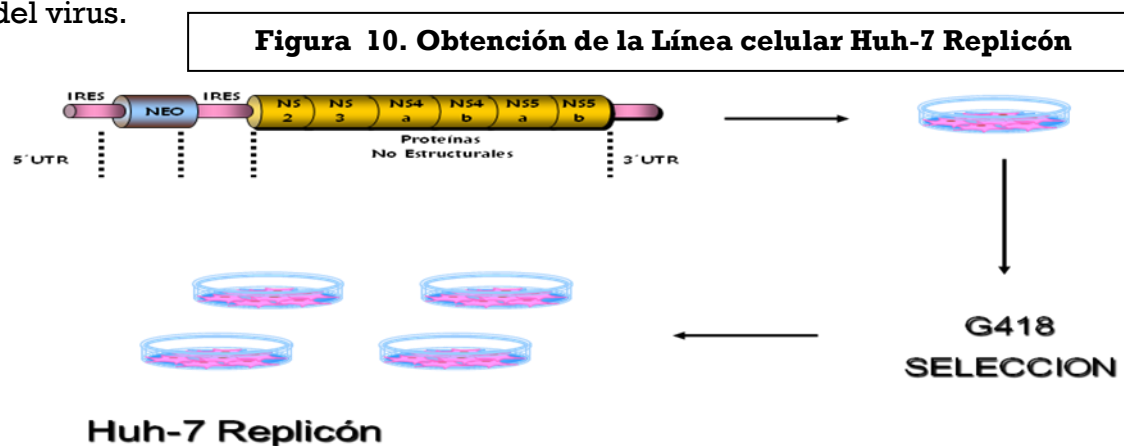
- TEMED y PSA de la casa comercial SIGMA CHEMICAL Co. (St. Louis, MO, USA)
- Membrana para transferencia Hybond-P PVDF de Amersham Biosciences (Freiburg, Germany).
- Se utilizó rojo Poceau S de la marca Amersco (Solon, Ohio, USA) para verificar la transferencia.
- El anticuerpo secundario fue anti-mouse de la marca PROMEGA (Madison, WI, USA).
- Se cuantificó de manera relativa el RNA del VHC y el gen Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se obtuvo primero el cDNA utilizando el estuche comercial High-Capacity cDNA Archive de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Y la PCR en tiempo real se realizó utilizando el ensayo HCVUANL-CV1 identificado con el número 65329451, que contiene la sonda TaqMan y los iniciadores que se alinean con la región 5'UTR del VHC. Se utilizó también en reactivo TaqMan Universal Master Mix de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).
- Los niveles intracelulares de prostaglandinas se evaluaron utilizando el estuche comercial PGE2 ELISA de la marca Amersham Biosciences (Freiburg, Germany).

El procesamiento de los datos se llevó a cabo en una computadora portátil (LAPTOP), marca HP modelo Pavilion dv1650us.

Para analizar datos, gráficos e imágenes se utilizaron los programas, Microsoft Office 2007 (Word, Powerpoint, Excel); se utilizaron además los programas Nero photosnap v.1209, Phoretix v2003.02, Primer Express v 1.55 de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA); para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v 11.5.

4.3.1 Cultivo Celular y Líneas Celulares Utilizadas

Se utilizó la línea celular de hepatoma humano Huh.7 Replicón que expresa establemente las proteínas no estructurales del VHC. Esta línea celular es uno de los modelos de que en la actualidad son utilizados para el estudio del VHC. En esta línea celular en particular se ha conseguido una transfección estable del replicón subgenómico del VHC, que codifica para las proteínas no estructurales del virus.



*Puig y Saiz. Gastroenterol Hepatol. 2001; 24: 506-510.
Bartenschlager R. Nature. 2002; 1: 911-916.*

En este modelo el replicón subgenómico posee la región 5'UTR del VHC, seguida del IRES del VHC dirigiendo la traducción del gen NEO de la neomicina el cual confiere resistencia a la geneticina 418, luego el IRES del virus de la encefalomiocarditis EMCV dirigiendo la traducción de las proteínas no estructurales del VHC las cuales están flanqueadas al final por la región 3'UTR del VHC.

Se utilizó también la línea celular Huh-7 derivadas de hepatoma, las cuales no expresan las proteínas del VHC.

Las dos líneas celulares fueron amablemente donadas a nuestro laboratorio por el Dr. A Koromilas (Lady Davies Institute, (McGill University, Canadá). Las células fueron crecidas en medio de cultivo DMEM, suplementado con SBF al 10%, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina bajo condiciones de atmosfera húmeda al 5% de CO₂ a 37°C. (ver anexo), a las células replicón se les agrego además 1% de aminoácidos no esenciales y 500 µg/ml de G418 (Geneticina; GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) como marcador de selección.

4.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

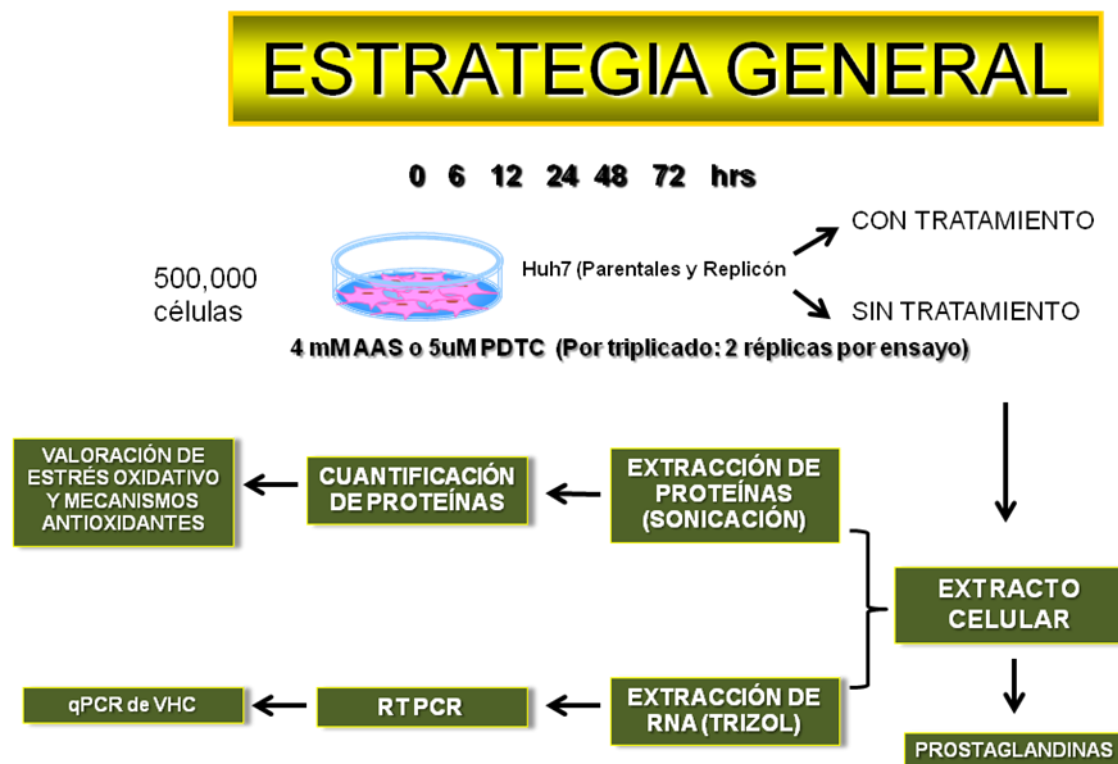
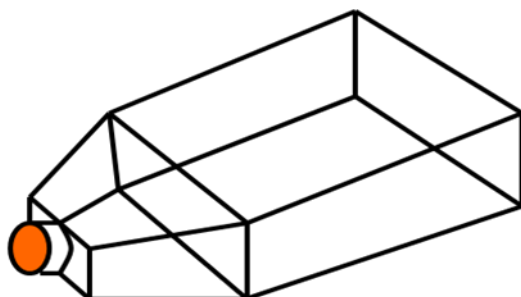


Figura 11. Estrategia Experimental

4.4.1 Esquema de Experimentos

Se crecieron las células Huh-7 parentales y replicón en los frascos T-75 agregando medio D-MEN y dejando crecer hasta confluencia de 70-80% (2×10^5 células por placa).



Células Huh-7
Parentales/Replicón

Al alcanzar la confluencia deseada se sembraron 500,000 células/pozo en placas de 100 mm (para las prostaglandinas se sembraron 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos y para las células destinadas a extracción de RNA

total se sembraron 200,000 células por pozo en placas de 6 pozos de 35mm). Se agregó medio DMEN 10% SBF y 1% AB. Se dejó crecer y al siguiente día se revisaron las células. A las 48 hrs de crecimiento se procedió al tratamiento (AAS o PDTTC), y se tomó este tiempo como tiempo cero. En este punto se realizó cambio de medio.

* A las células replicón se adicionó también G418 (6.7uL/ml y aa's esenciales 1%)

Se realizó cada condición por duplicado. Y cada experimento por lo menos tres veces. Terminados los tiempos (0, 6, 12, 24, 48, 72 hrs) se realizó la extracción de proteínas para el ensayo de TBARS, ensayo de SOD, ensayo de Gpx, ensayo de Oxiblot; para la determinación de prostaglandinas se realizó la lisis celular siguiendo los pasos del protocolo (anexo); para la extracción celular se siguió el protocolo preestablecido para Extracción de RNA por método de TRIZOL .

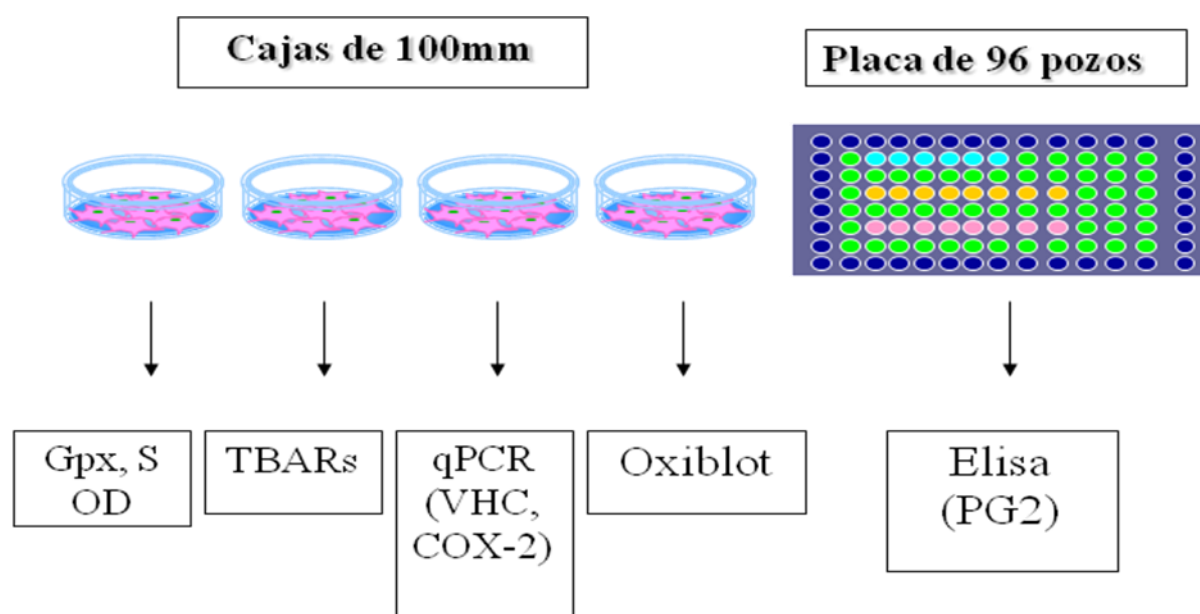


Figura 12. Esquema de Experimentos

4.4.2 Tratamiento con 4mM de AAS y 5 uM de PDTTC

* El AAS 4mM se preparó disolviendo 0.00720g de AAS en 10 ml de DMEN (10% SBF y 1% de A/B), para las células replicón se le agregará al medio 1% de aa's esenciales y 6.7uL/ml de G418.



* El PDTC 5 μ M se preparó disolviendo 0.00532g de PDTC en el medio de cultivo.

4.4.3 Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas para las determinaciones de Oxiblot, TBARS, SOD, Gpx. Se rasparon las células con un raspador de células, agregando 2ml de PBS 1x – EDTA 5mM. Se resuspendieron las células en buffer HEPES en tubos falcón de 15 ml y se lisaron las células por sonicación a una intensidad de 7% en hielo, se aplicó sonicación a las muestras a intervalos de 30 segundos 3 veces.

Si no se realizaba el análisis de inmediato, el extracto celular era almacenado a – 80°C.

Enseguida se cuantificó la concentración de proteínas totales de cada muestra por el método de Bradford (anexo). Las proteínas eran luego diluidas en buffer HEPES para igualar las concentraciones de todas a 5 μ g/ μ L. Una vez cuantificadas las muestras se dividieron en 4 porciones para realizar las determinaciones de TBARS, Oxiblot, SOD, y Gpx.

4.4.4 Extracción de RNA total

Para el análisis de niveles de RNA viral se realizó la extracción de RNA total. Para ello una vez cumplidos los tiempos de tratamiento se lisaron las células y se extrajo el RNA

- Se adicionó 1ml de Trizol y luego el contenido de la placa se agregó a un tubo eppendorf de 2ml.
- El tubo se incubó a temperatura ambiente por 5 min, pasado el tiempo se adicionaron 200 μ L de cloroformo por cada ml de Trizol agregado y se mezclo por inversión por 15 segundos.
- El tubo se incubo en hielo de 2 a 3 minutos y se centrifugó luego a 13,000 rpm a 4°C por 15 minutos.
- Después de la centrifugación se recuperó la fase acuosa para precipitación con isopropanol, se agregaron 500 μ L de isopropanol por cada ml de Trizol agregado.



- Se incubó a -70°C por 15 min y se centrifugó la muestra nuevamente a 13,000 rpm a 4°C por 15 min.
- Finalmente se resuspendió la pastilla en agua DEPC 30 μL .

4.4.5 Cuantificación de RNA del VHC mediante PCR cuantitativa en Tiempo Real

La determinación se realizó en dos pasos:

1. Síntesis de cDNA:

- a. El RNA total extraído de las células Huh-7 Replicón fue sujeto a retrotranscripción.

Cuadro 2. Condiciones de Reacción para Retrotranscripción

Reactivos	Concentración inicial	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer	10x	2 μL	1x
dNTPs	25x	0.8 μL	1x
Random Primers	10 μM	2 μL	1x
Enzima Multiscribe RT	50 U/ μL	1 μL	2.5 U
RNA	Dilución 1:10	10 μL	-----
Agua MiliQ	-----	4.2 μL	-----
Volumen final		20 μL	

Tabla I. Programa de retrotranscripción utilizado

TEMPERATURA	TIEMPO
25 $^{\circ}\text{C}$	10 min
37 $^{\circ}\text{C}$	2 hrs

2. PCR cuantitativa en tiempo real:

Se amplificó una parte de la región 5'UTR del VHC por ser una región altamente conservada del virus. Se utilizaron los iniciadores y la sonda:

- 5'-GCGTCTAGGCCATGGCGTTA-3' (PRIMER 1)
- 5'-GGTATCACCAGACGCCTTGG-3' (PRIMER 2)
- 5'-FAM-CATACTCACAGCACGTC-DABCYL-3' (SONDA)

Cuadro 3. Condiciones para PCR cuantitativa en tiempo real

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN DE REACCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL
TaqMan Universal PCR Master Mix	2x	12.5 µL	1x
Ensayo (VHC, GAPDH)	20x	1.25 µL	1x
cDNA diluido en agua DEPC	-----	11.25 µL	-----
TOTAL		25 µL	

Condiciones de amplificación utilizando el Master Mix, con número de catálogo 4304437:

Cuadro 4. Condiciones de amplificación, PCR Cuantitativa en Tiempo Real

Termociclador	Tiempos y temperaturas			
	Condiciones iniciales		40 ciclos	
			Desnaturalización	Alineamiento y extensión
7000	mantener	mantener	CICLO	
	2 min 50°C	10 min 95°C	15 seg. 95°C	1 min 60°C

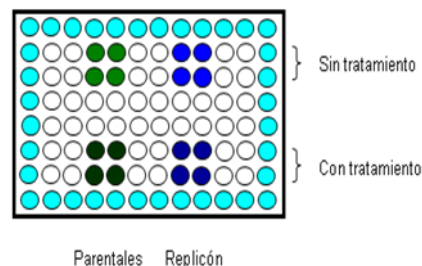
El GAPDH y EL VHC se amplificaron bajo las mismas condiciones para normalizar.

4.4.6 Determinación de Niveles de Prostaglandinas

Todos los reactivos del estuche comercial deben alcanzar la temperatura ambiente antes de usarse.

Cada pozo fue tratado de la siguiente manera:

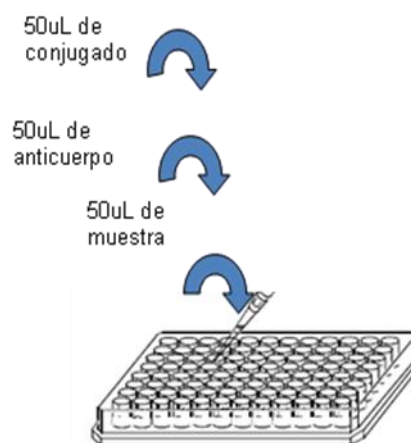
1. Las células fueron previamente contadas y resuspendidas en medio D-MEN 10% SBF, 1% A/B. Se agregó la cantidad de 10,000 células por pozo (200µL de medio).
2. Las células de incubaron por 48 hrs. A las 24 hrs se revisan las células.



3. A las 48 hrs se comenzó el tratamiento y ese fue el tiempo 0.
4. Previamente se preparó el medio para células sin tratamiento.
5. A todas las células se les retiró el medio y se reemplazó con medio nuevo. (DMEM, 20% SFB, 1% A/B). Las células que recibieron el tratamiento con aspirina se les agregó medio preparado previamente con el AAS.
6. Se determinaron los niveles de prostaglandinas a cada uno de los tiempos.
7. Se retiró el medio de cada pozo y se agregaron 100uL de PBS 1X para lavar las células. (con cuidado de no levantar las células).

Se retiró el PBS 1X luego de un minuto y se agregaron 100uL de buffer de lisis 1 (solución de trabajo) que viene en el estuche comercial. Y se rasparon las células con una puntilla. Se incubó por 10 min

9. Después de la incubación se realizaron aspirados con la pipeta para favorecer la lisis celular. Se evaluó la lisis celular al microscopio.
10. El lisado celular se procesó inmediatamente.
11. Se pipeteó 50uL de cada muestra en el pozo indicado. Luego 50uL del anticuerpo diluido y finalmente 50uL del conjugado diluido. Se cubrió la placa con la cubierta proporcionada en el estuche comercial y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora.
12. Se aspiró y lavó cada pozo 4 veces con buffer de lavado verificando que cada pozo fuera llenado y vaciado en cada lavado.
13. Se secó la placa en un paño e inmediatamente agregó el sustrato enzimático. 150uL a cada pozo. Incubar 30 min a temp. Ambiente.
14. El color azul desarrollado se leyó a 630nm. Se detuvo la reacción en un punto determinado añadiendo 100uL de ácido sulfúrico 1M a cada pozo.
15. El color amarillo desarrollado se leyó a 450nm en los siguientes 30 min. (Realizar la lectura en el lector de placas de ELISA Biotek en el programa PGE2 04



Los resultados se calcularon utilizando la curva previamente determinada con los estándares del estuche comercial.



4.4.7 Protocolo de Experimento (TBARS, OXIBLOT, SOD, GPX)

1. Para despegar las células de la placa se siguió el protocolo ya establecido en nuestro laboratorio, utilizando 2ml PBS 1X + EDTA 5 mM y raspando con el raspador. Se colocaron las células en tubos falcón de 15ml y se centrifugaron las células a 2,500 g por 10 min a 4°C
2. Se resuspendieron las células en 10 uL de buffer HEPES 20 mM pH 7.2 con 1 mM de EGTA, 210mM manitol y 70 mM de sucrosa.
3. Se sometieron las muestras a 1 ciclo de frío y calor 20 min en hielo a – 20°C seguidos de 10 min a 37°C.
4. Luego se sonicaron las células en frío a intervalos de 10 segundos. A 7% de potencia del sonicador.
5. Centrifugamos a 3,500 x g por 20 minutos a 4°C
6. Removimos el sobrenadante para análisis. Si no se analizaba al momento, congelábamos a – 80°C. La muestra es estable al menos por un mes.
7. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford y se procesaron las muestras según el análisis a realizar.

** Nota: Este experimento se realizó para cada análisis por separado, excepto en el caso de SOD y GPX, en los cuales las muestras para análisis pueden tomarse del mismo extracto proteico.

4.4.8 SOD Assay (Superóxido Dismutase assay)

- Preparación de soluciones estándar:
 1. Diluimos 20 uL del estándar (vial #4) con 1.98 ml de Buffer de muestra para obtener la solución SOD stock.
 2. Tomamos 7 tubos de vidrio y los marcamos de la A-G. Llenamos los tubos como se describe en la tabla.

TUBO	SOD STOCK (uL)	SAMPLE BUFFER (uL)	FINAL SOD ACTIVITY (U/ml)
A	0	1,000	0
B	20	980	0.025
C	40	960	0.05
D	80	920	0.1
E	120	880	0.15
F	160	840	0.2
G	200	800	0.25

3. Agregamos 200 uL de la dilución detectora de radicales y 10 uL de estándar en los pozos designados para cada uno de ellos.



4. Para los pozos de muestra se agregaron 200 uL de solución detectora de radicales y 10 uL de muestra.
5. La reacción se inició adicionando 20uL de la solución de xantina oxidasa a todos los pozos en uso.
6. Mezclamos la placa por unos segundos y luego cubrimos e incubamos la placa por 20 min en agitación.
7. La absorbancia fue leída a 450 nm en el lector de placas. Programa 6.

4.4.8.1 Preparación de Reactivos

- ❖ Buffer de ensayo (assay buffer 10 x) – (vial #1):

Diluimos 3 ml del buffer de ensayo concentrado con 27 ml de H₂O miliQ. Almacenado a 4°C esta solución es viable por 2 meses.

- ❖ Buffer de muestra (simple buffer 10 x) – (vial #2):

Diluimos 2 ml del buffer de muestra concentrado con 18 ml de H₂O miliQ. Almacenado a 4°C esta solución es viable por 2 meses.

- ❖ Detector de radicales (radical detector) – (vial #3):

Este vial contiene una solución de sal de tetrazolium. Justo antes de utilizar se transfirieron 50 uL de la solución a otro vial y diluimos con 19.95 ml de buffer de ensayo diluido.

- ❖ SOD estándar – vial #4:

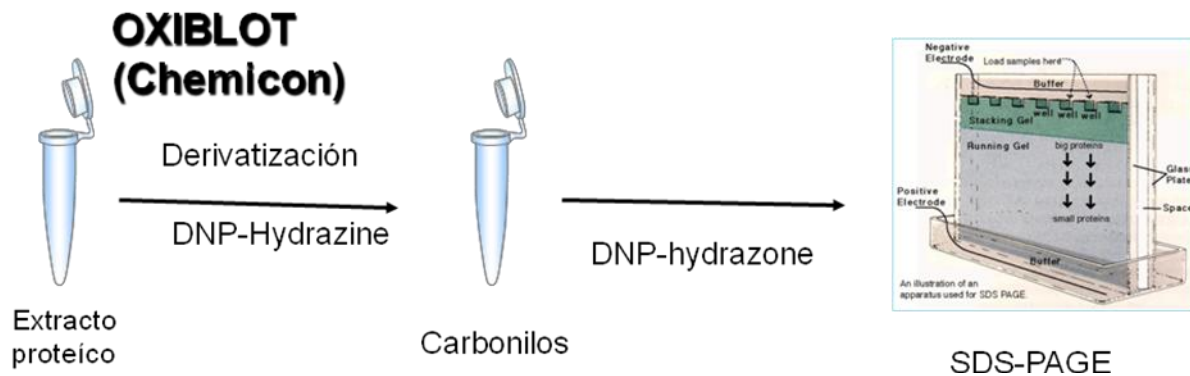
Este vial contiene una solución de SOD (Cu/Zn) superoxido dismutasa. La enzima esta lista para su uso. Cuando se descongela para usar debe mantenerse en hielo.

- ❖ Xantina oxidasa – vial #5:

Los viales contienen una solución de xantina oxidasa. Justo antes de utilizar descongelamos un vial y transferimos 50 uL a otro vial. Luego diluimos con 1.95 ml del buffer de muestra diluido. Mantuvimos la enzima descongelada y la solución diluida en hielo. La solución diluida fue viable por 1 hora. *No se debe congelar la enzima descongelada otra vez.

4.4.9 Proteínas Oxidadas (Oxiblot)

PROTEINAS OXIDADAS (OXIBLOT)



- 0, 12, 24, 48 y 72 horas.
- Una vez realizada la extracción de proteínas:
- Al tubo destinado para el análisis de oxiblot se le agregó un volumen de 2-mercaptoethanol para obtener una concentración Final de 1% de mercaptoethanol.
- Se determinó la concentración De proteínas y se escogió un volumen equivalente a 20ug de proteína.
- Se separaron dos alícuotas de cada muestra para el análisis, una se designó como control la otra como muestra problema.
- Se transfirieron 5ul (o el volumen calculado para 10ug de proteínas) a un tubo eppendorf de 1.5ml.
- Desnaturalizamos las proteínas agregando 5uL de SDS 12% (o la cantidad equivalente para obtener una concentración Final de SDS 6%).
- Se derivatizó la muestra agregando un volumen igual (en este caso 10uL) de solución 1X DNPH a la muestra. Al tubo designado control se le agregó la solución de derivatización control.



- Se incubaron ambos tubos a temperatura ambiente por 15 min. (no debe incubarse más de 30 min en este paso).
- Agregamos 7.5uL de la sol. De neutralización a ambos tubos.

Las muestras están listas para ser cargadas en el gel. (a estas alturas las muestras pueden ser almacenadas hasta por una semana a 4°C).

4.4.9.1 Westernblot (Oxiblot)

** Al usar por primera vez estándar de proteínas se incubó hasta alcanzar la temperatura ambiente. Transferimos la cantidad necesaria para el análisis a un tubo y el remanente debe ser alicuotado en tubos y almacenado a -20°C.

Combinamos 2.5uL del estándar de peso molecular con 20uL de buffer de carga 1X.

**Nota: No es necesario agregar buffer de carga a las muestras ya que la adición de la solución neutralizante proporciona la suficiente densidad para que la muestra se vaya al fondo del pozo. Si embargo puede agregarse si ningún efecto adverso.

**Nota: El DNP-BSA en la solución de 2.5uL contiene 100 femtomoles de residuos DNP determinados espectrofotométricamente.

- Luego de corrido el gel, se realizó la transferencia a la membrana. (Protocolo de transferencia)
- Una vez terminada la transferencia se procedió con el WB.
- Se bloqueó la membrana con la solución Blocking/Dilution buffer diluida en BSA, por una hora en agitación suave. (0.3 ml/cm² de membrana)
- Diluimos el anticuerpo primario 1:150 en el buffer de bloqueo justo antes de utilizar.
- Agregamos suficiente buffer para cubrir la membrana.
- Incubamos la membrana con el anticuerpo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Enjuagamos la membrana con PBS-T 1X tres veces. La primera por 15 min y la segunda y tercera por 5 min a temperatura ambiente.
- Incubamos la membrana con el anticuerpo 2 diluido 1: 300. incubar 1 hora a temperatura ambiente.



- Enjuagamos la membrana nuevamente como de la misma manera ya descrita.
- Eliminamos el exceso de buffer y preparar los reactivos para la reacción de quimioluminiscencia.

Seguimos los pasos del estuche comercial ECL Amersham.

4.4.10 TBARs análisis

******* Todos los procedimientos se realizaron en frío*******

1. Del tubo con el extracto celular destinado para TBARS de cuantificó la concentración de proteínas.
2. Etiquetamos los tubos como estándar o número de muestra.
3. Agregamos 100 uL de estándar o muestra a los respectivos tubos.
4. Agregamos 100 uL de la solución SDS a cada tubo y mezclar.
5. Agregamos 2.5 ml del reactivo TBA/buffer forzándolo por la pared del tubo.
6. Cubrimos cada tubo con una canica e incubar a 95°C por 1 hora (baño maría).
7. Removimos del baño y atemperar en hielo por 10 min.
8. Centrifugamos a 3000 rpm por 15 min. Y separar el sobrenadante para análisis.
9. Se leyó la fluorescencia a 530nm de excitación y 550nm de emisión.
10. Los resultados se calcularon por medio de una curva estándar realizada con los estándares del kit.

4.7.4 Glutación Peroxidasa análisis

1. Del tubo destinado a la determinación de Glutación Peroxidasa y previamente cuantificada la concentración de proteínas se prosiguió:
2. En cada cubeta se pipeteó 870uL de Working Solution y 60uL de Star solution.
3. Agregamos 30uL de muestra y agua destilada para el blanco. Mezclamos por inversión 3 veces.
4. Leímos el cambio en la absorbancia a 340nm por 1 min luego de 40 segundos lag time.
5. Calculamos la actividad de GPx siguiendo el procedimiento del inserto.



4.8 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos fueron realizados por triplicado y en cada uno se incluyeron 2 réplicas por condición. Se calculó el media y desviación estándar. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de ANOVA de un factor y prueba de Dunnett. Se utilizaron los programas Microsoft Excel 2007 y SPSS v 11.5.

CAPÍTULO V

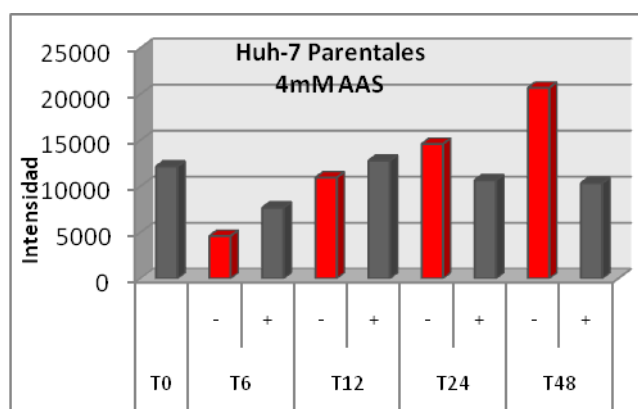
RESULTADOS

5.1 EL ACIDO ACETILSALICILICO REDUCE LOS NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS CÉLULAS HUH-7 PARENTALES Y REPLICÓN.

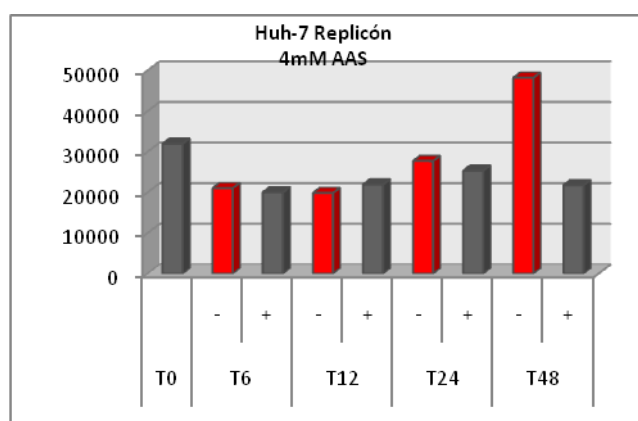
Para evaluar los niveles de estrés oxidativo y el efecto del AAS en células parentales y replicón, las células fueron expuestas a una concentración de 4mM de AAS por 12,24 y 48 horas. Finalizados los tiempos se hizo la extracción y cuantificación de proteínas y se realizó la determinación de proteínas oxidadas con el kit Oxiblot. Se observa que el tratamiento con 4mM de AAS reduce los niveles de estrés oxidativo, al evaluar los marcadores de proteínas y lípidos oxidados.

Fig. 13 Proteínas oxidadas (Oxiblot)

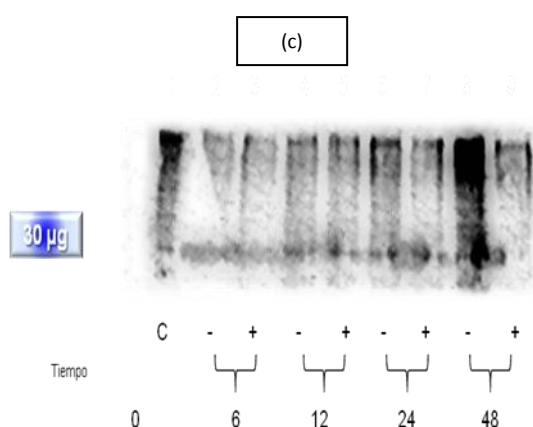
Figura 13. Efecto del AAS en los niveles de proteínas oxidadas. 5×10^5 células (Parentales (a) y replicón (b)) sembradas en placas de 100mm tratadas con 4 mM de AAS y sin tratamiento por 0,12,24 y 48 hrs. Los niveles de proteínas oxidadas fueron cuantificados utilizando el kit oxiblot y las imágenes obtenidas fueron sometidas a análisis densitométrico (Phoretix 1d v2003.02) (c) Western blot mostrando la señal de proteínas oxidadas. Células Huh-7 Replicón, tratamiento con 4mM de AAS. Se cargaron 30 μ g de proteínas.



(a)



(b)



5.1.1 Ácido Tiobarbitúrico TBARS

También se determinaron los niveles de Acido Tiobarbitúrico como marcador de estrés oxidativo.

Figura 14

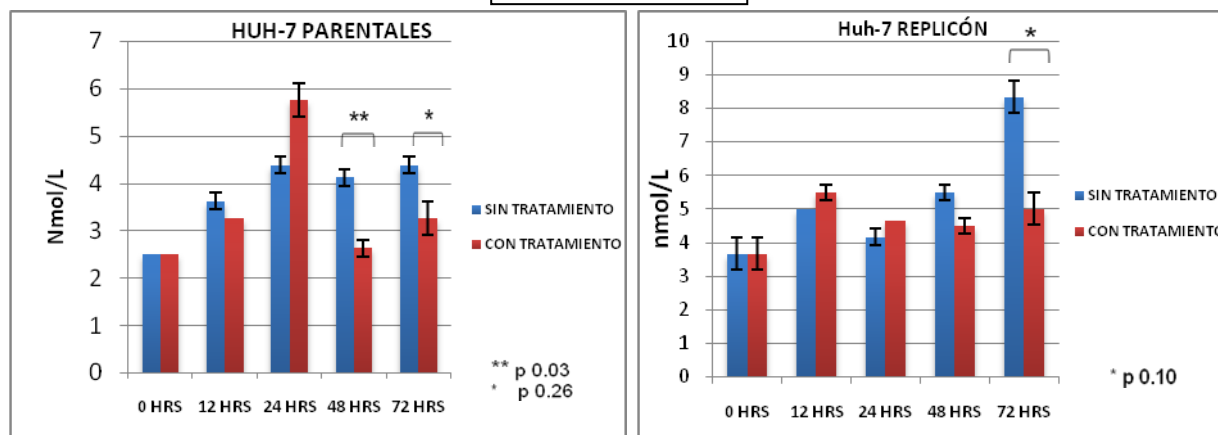


Fig. 14. Evaluación de los niveles de Ácido Tiobarbitúrico en células Huh-7 Parentales y Replicón. 5×10^5 células por placa en placas de 100mm. Las células fueron tratadas con 4 mM de AAS por 12, 24, 48 y 72 horas. Como control se utilizaron células no tratadas. Las gráficas muestran niveles de TBARS en nmoles/L y son el promedio de 3 experimentos aislados, se incluyeron 2 réplicas por condición. Se calculo desviación estándar, ANOVA, Dunnet. A) Células Parentales; b) Células Replicón

5.2 EL TRATAMIENTO CON 4 mM DE AAS AUMENTA LA ACTIVIDAD LA ENZIMA SUPEROXIDO DISMUTASA EN LAS LINEAS CELULARES HUH-7 PARENTALES Y REPLICÓN

Para evaluar el efecto del AAS en los sistemas antioxidantes celulares. Se midieron los niveles de Actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa y Glutación Peroxidasa, utilizando los estuches comerciales respectivos. Las células tanto parentales como Replicón, fueron tratadas con 4mM de AAS por 12, 24, 48 y 72 hrs. Como control se utilizaron células sin tratamiento. Se observó que el tratamiento con 4 mM de AAS aumenta la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa, aumento que es significativo a las 72 hrs post-tratamiento, este efecto se observó en ambas líneas celulares, tanto parentales como replicón.

La enzima Glutación Peroxidasa no mostro cambio significativo al tratar las células con AAS. Sin embargo discretamente se observa cierta tendencia a disminuir.

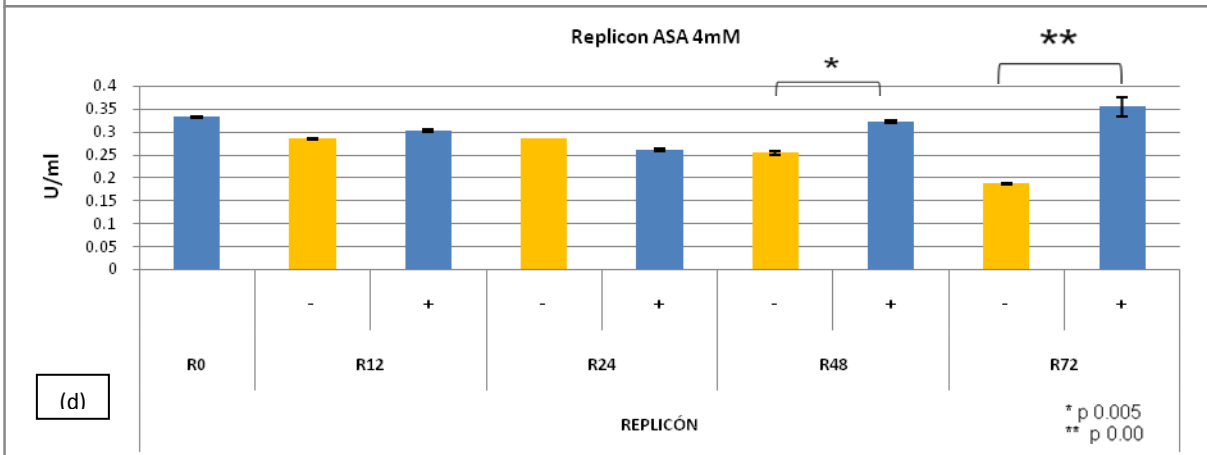
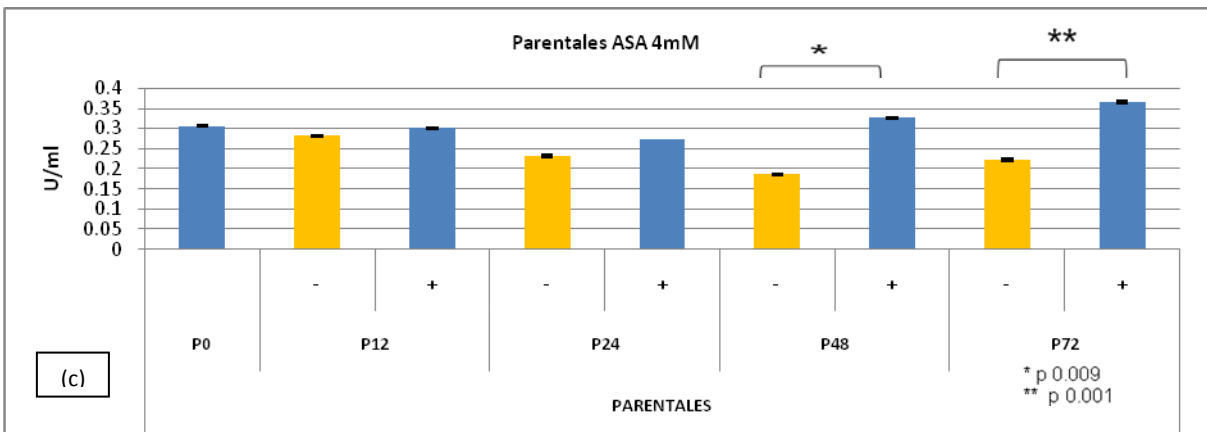
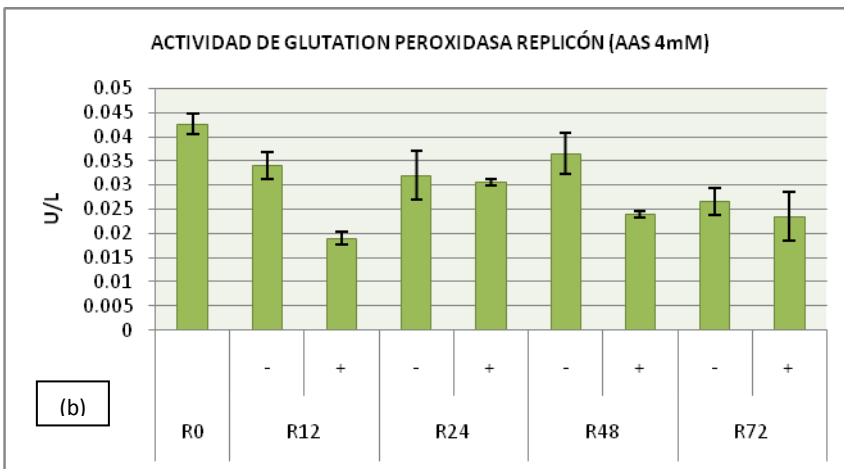
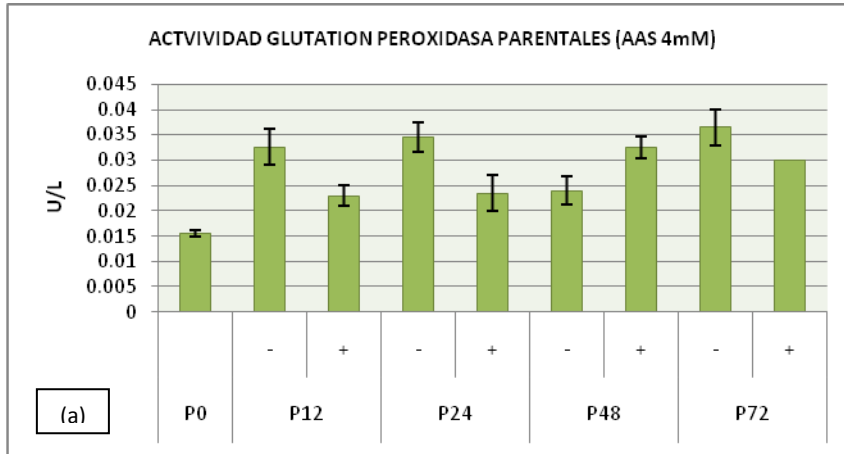


Figura 16

Fig.16. Evaluación del efecto del AAS sobre las enzimas antioxidantes celulares; Superóxido Dismutasa y Glutación Peroxidasa en las líneas celulares Parental y Replicón. 5×10^5 células sembradas en placas de 100mm. Las células fueron tratadas con 4 mM de AAS e incubadas por 12,24,48 y 72 horas. Se utilizaron células sin tratamiento como control. Terminados los tiempos de incubación se extrajeron las proteínas totales, Se cuantificaron y se midieron los niveles de Glutación peroxidasa (fig. 16) Parentales (a) y replicón (b). También se evaluaron los niveles de la enzima Superóxido Dismutasa otro indicador de la capacidad antioxidante de la célula. Se trataron las células con ASS 4mM por 12,24,48 y 72 hrs. Pasado el tiempo se evaluó la actividad de la enzima SOD (fig. 16). El análisis se hizo en células parentales (c) y Replicón (d).

5.3 EL AAS TIENE UN EFECTO INHIBIDOR EN LOS NIVELES DE PROSTAGLANDINAS

Se determinaron los niveles de prostaglandinas en las líneas celulares Huh-7 Parentales y replicón. Es bien sabido que el AAS inhibe la actividad de la enzima COX-2 cuyo producto principal son las prostaglandinas. En este experimento las células fueron expuestas a AAS 4mM por 6,12,24 y 48 horas, tras las cuales se evaluaron los niveles de prostaglandinas PGE₂. Como control se utilizaron células sin tratamiento incubadas a los tiempos correspondientes. Se observó que la exposición de las células, tanto parentales como replicón (fig. 6) a 4mM de AAS, reducía los niveles de PGE₂ hasta en un 50%.

Figura 17. Niveles de Prostaglandinas (tratamiento con 4mM de AAS)

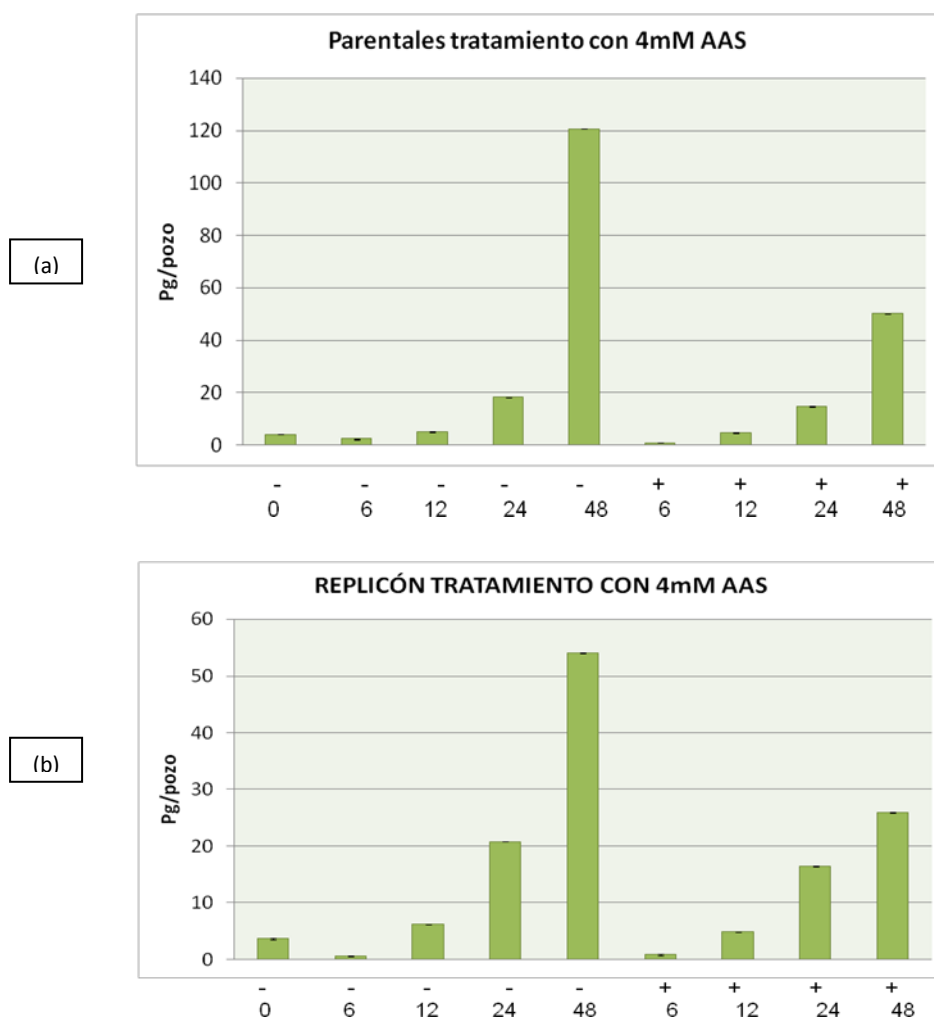


Fig. 17. Evaluación de los niveles de Prostaglandinas PGE₂ tras el tratamiento con 4mM de AAS. Células Huh-7 Parentales y replicón a 6,12,24 y 48 horas post tratamiento. 1 x 10⁴ células sembradas en placas de 96 pozos, 2 réplicas por condición. Se trataron las células con 4mM de AAS y se incubaron a 6,12,24 y 48 horas. Se utilizaron células sin tratamiento como control. Los resultados mostrados son la media de las lecturas obtenidas. (a)Parentales (b) Replicón.

5.4 EL AAS TIENE UN EFECTO NEGATIVO EN LOS NIVELES DE RNA DEL VHC Y ESTE EFECTO ES DEPENDIENTE DEL TIEMPO DE EXPOSICION.

Determinamos el efecto negativo del AAS en los niveles de RNA viral exponiendo las células Huh-7 parentales y replicón a AAS 4mM durante 24, 48 y 72 horas. Finalizado el tiempo de incubación se extrajo el RNA total y se sometió a retrotranscripción seguida de PCR semi-cuantitativa en tiempo real. El gen GAPDH sirvo como gen endógeno de expresión constitutiva. El valor máximo de inhibición fue alcanzado a las 72 horas.

Figura 18. Efecto inhibitor del AAS sobre los niveles de RNA del VHC

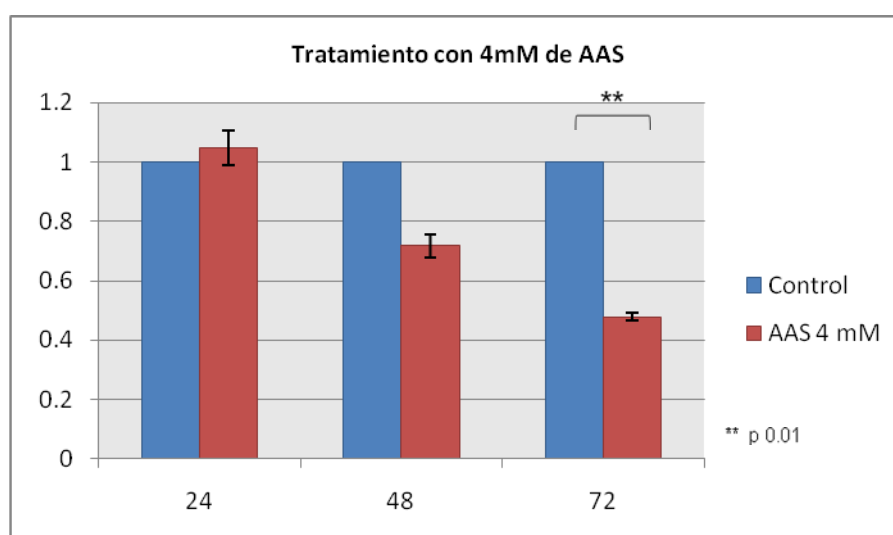


Fig.18. Efecto del AAS en células Huh-7 Replicón a 24, 48 y 72 horas post tratamiento. Se sembraron 2×10^5 células por pozo en placas de 6 pozos de 35mm, las células fueron tratadas con 4mM de AAS a 24, 48 y 72 horas. Se utilizaron células sin tratamiento como control. Se calcularon los niveles de RNA viral mediante los RT PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan y calculando los CT's de la curva de amplificación. Se normalizó con el gen interno de expresión constitutiva, GAPDH. Los resultados son la media de tres réplicas por cada condición.

5.5 EFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTIVIRAL DEL AAS

En base a estos resultados podemos sugerir que el AAS posee propiedades antioxidantes ya que redujo los niveles de proteínas y lípidos oxidados, marcadores directos del estado oxidativo celular, en nuestro modelo *in vitro*. Por otra parte el AAS presentó también un efecto antiviral al reducir los niveles de RNA viral en la línea celular Huh-7 Replicón que expresa las proteínas no estructurales del VHC.

Figura 19. El AAS tiene un efecto tanto antiviral como antioxidante

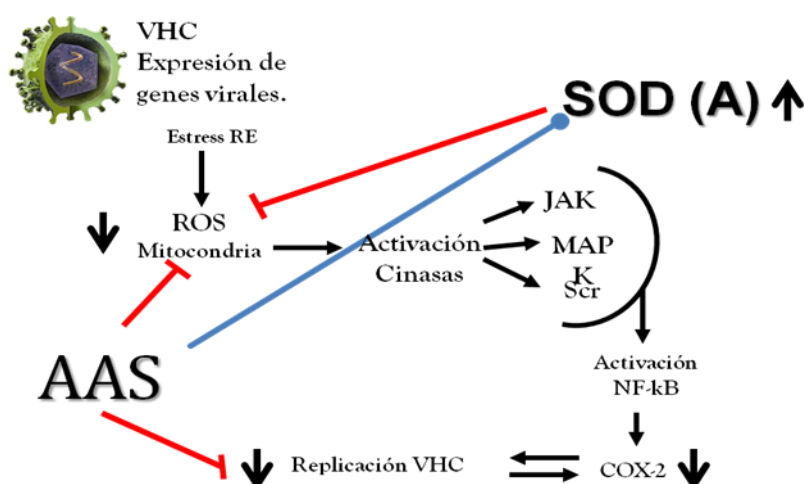


Fig. 19. El AAS tiene un efecto antioxidante y antiviral contra el VHC. En nuestro modelo experimental utilizando las líneas celulares Huh-7, parentales y Replicón, el AAS presentó un efecto antioxidante al disminuir los niveles de proteínas y lípidos oxidados, y un efecto antiviral al reducir los niveles de RNA del VHC.

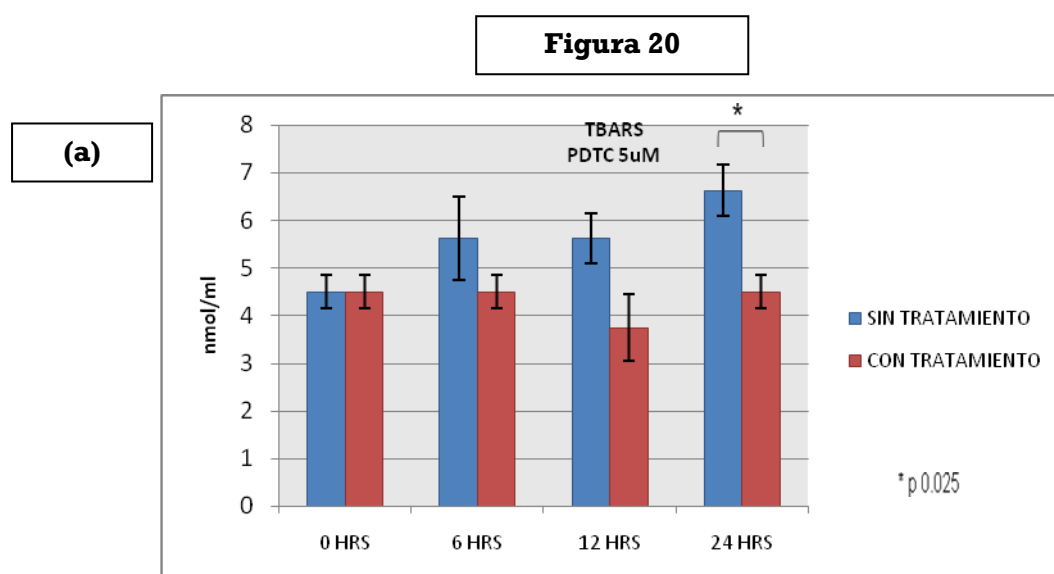
5.6 EVALUACION DEL EFECTO DE UN ANTIOXIDANTE (PDCT) SOBRE LOS NIVELES DE RNA DEL VHC.

Ya que el AAS presentó tanto un efecto antioxidante como antiviral en nuestro modelo experimental, y ya que estos dos efectos de AAS sucedieron de manera simultánea, se asume que pudieran estar relacionados y que sean las propiedades antioxidantes del AAS las que medien su efecto antiviral sobre el VHC. De esta manera nos propusimos a evaluar el efecto de un antioxidante comúnmente utilizado en los ensayos *in vitro* para medir estrés oxidativo y

capacidad antioxidante, este es el Pirrolidin Ditiocarbamato (PDTC). El PDTC es un antioxidante comúnmente utilizado en experimentos in vitro para estudiar el rol de las especies reactivas de oxígeno en procesos biológicos, y su naturaleza como un potente antioxidante esta mas que comprobada. Al PDTC también se le han atribuido otras propiedades como lo son el inhibir al factor nuclear kB (NF-kB), el cual está involucrado en diversas patologías incluyendo la infección por VHC y también se le han atribuido al PDTC propiedades antivirales, específicamente en un estudio sobre el virus de la Influenza³³.

5.7 El PDTC reduce los niveles de Estrés Oxidativo en las Células tratadas.

Para evaluar el efecto del PDTC sobre los niveles de estrés oxidativo, las células Huh-7 replicón, fueron expuestas a una concentración de 5 μ M de PDTC por 6, 12 y 24 horas. Post-tratamiento se evaluaron los niveles de proteínas oxidadas (Oxiblot) y Acido Tiobarbitúrico (TBARS). Se observó que el PDTC disminuye los niveles tanto de proteínas como de lípidos oxidados, efecto que se hizo significativo a las 24 horas post-tratamiento.



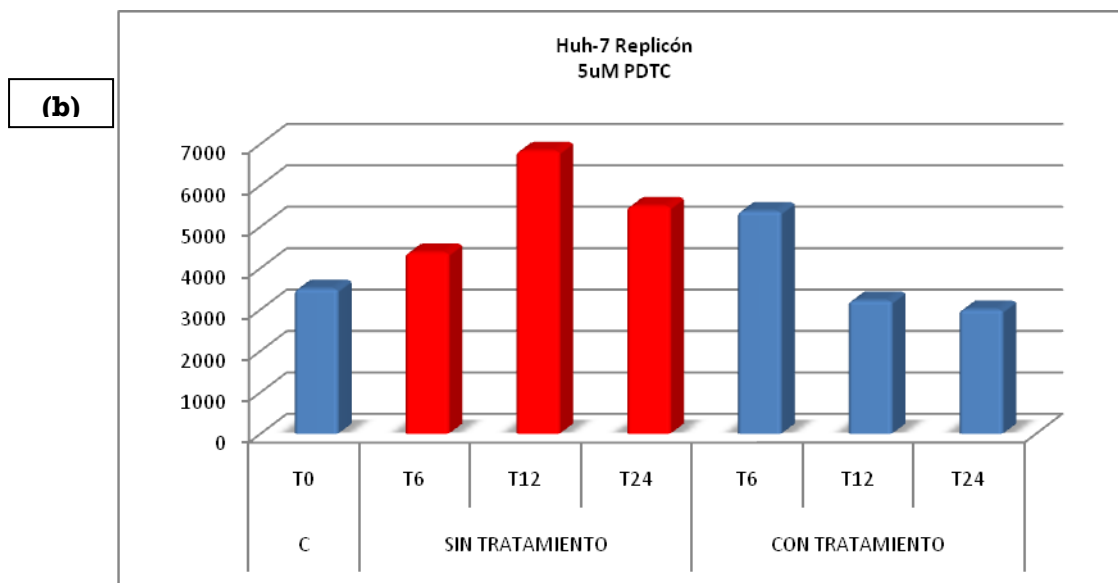
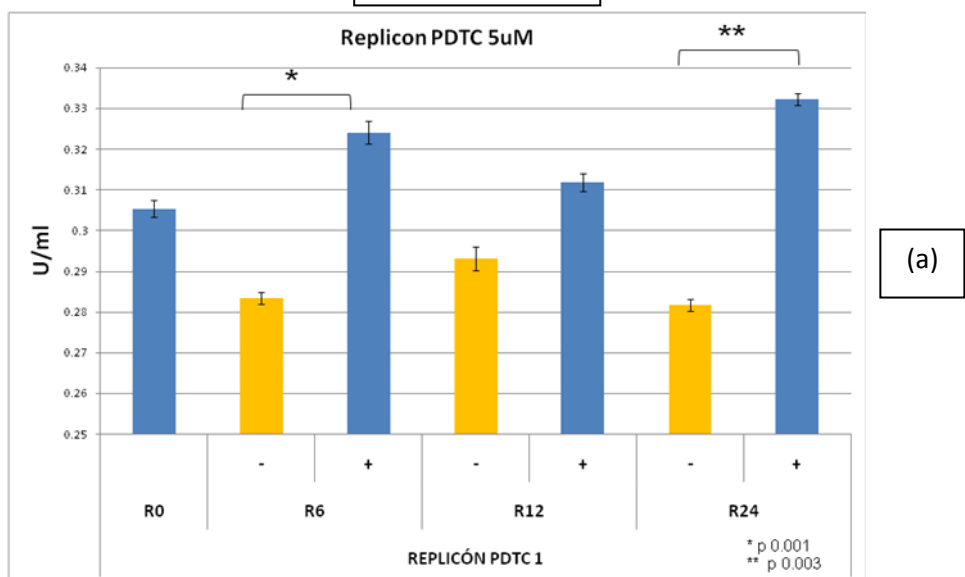


Fig. 20. El PDTC disminuyó los niveles de lípidos(a) y proteínas (b) oxidados en la línea células Huh-7 Replicón. Se sembraron 5×10^5 células en placas de 100mm. Se expusieron las células a una concentración de $5 \mu\text{M}$ de PDTC a 6, 12 y 24 horas. Se utilizaron como control células no tratadas. Se utilizaron $100 \mu\text{L}$ de muestra a $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas para el análisis de TBARS y se cargaron $30 \mu\text{g}$ de proteínas en el gel para el ensayo de Oxiblot.

5.8 EL PDTC TIENE UN EFECTO POSITIVO EN LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUPEROXIDO DISMUTASA

Al tratar las células Huh-7 Replicón con $5\mu\text{M}$ de PDTC y medir la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa, observamos que la actividad de esta enzima se mostraba aumentada en las células expuestas al tratamiento en comparación a las células no tratadas.

Figura 21



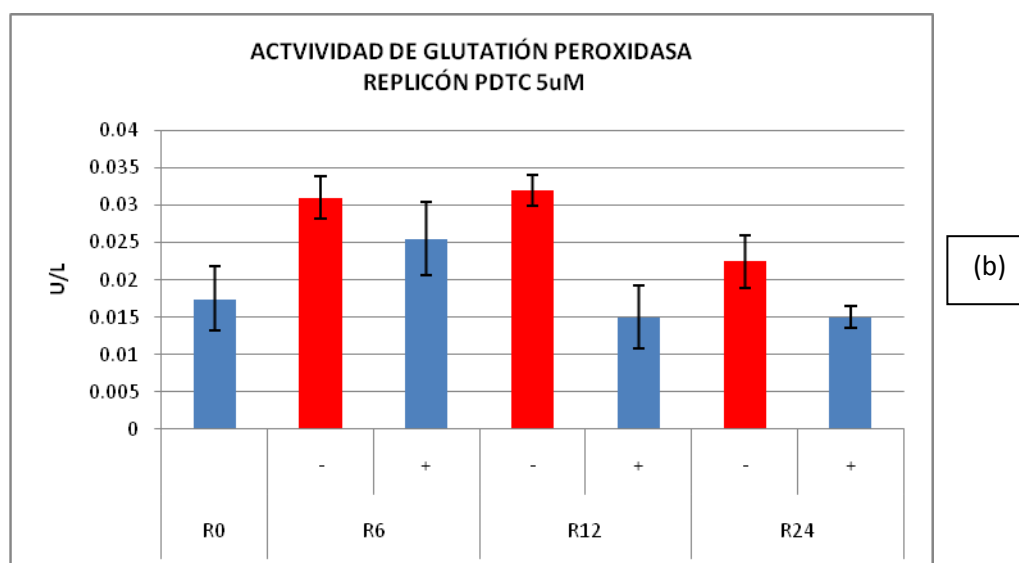


Fig. 21. El PDTC aumentó la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa en las células tratadas y modificó discretamente la actividad de la Glutación peroxidasa. 5×10^5 células por placa en placas de 100mm. Las células fueron expuestas a $5\mu\text{M}$ de PDTC por 6, 12 y 24 horas. Post-tratamiento se determinaron las actividades de las enzimas SOD(a) y Glutación Peroxidasa(b). El resultado es el promedio de 3 experimentos aislados. Se incluyeron 2 réplicas por condición. Se calculó desviación estándar y se utilizó ANOVA y Dunnet para el análisis estadístico.

5.9 EL PDTC PRESENTÓ UN EFECTO ANTIVIRAL AL REDUCIR LOS NIVELES DE RNA DEL VHC EN LAS CÉLULAS HUH-7 REPLICÓN TRATADAS

Para evaluar si el PDTC, al ser un antioxidante en ninguna manera relacionado químicamente o biológicamente con el AAS, tenía algún efecto antiviral se trataron las células Huh-7 replicón, las cuales expresan el replicón subgenómico del VHC, con $5\mu\text{M}$ de PDTC. Las células se incubaron a 6, 12 y 24 horas. Los niveles de RNA viral fueron evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de resultados mostró que el PDTC presentó propiedades antivirales al regular negativamente los niveles de RNA viral (fig.22) y que este efecto se hizo significativo a las 24 horas post-tratamiento.

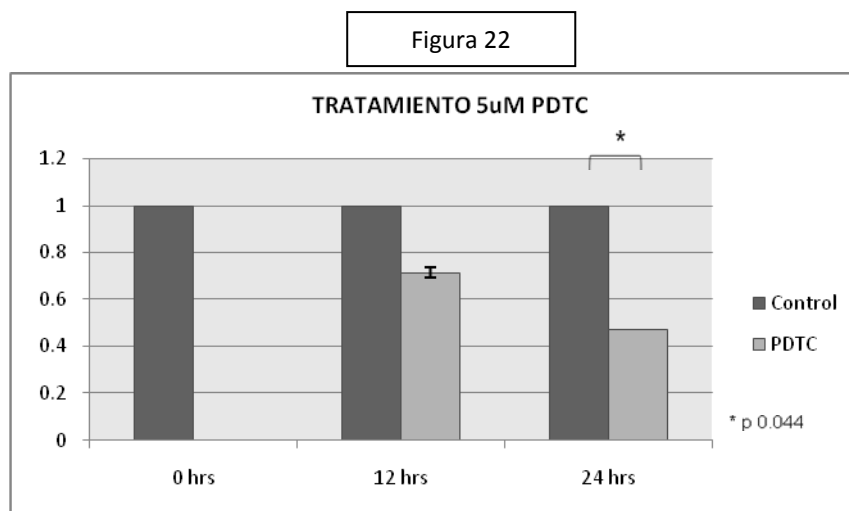


Fig. 22. Efecto de regulación negativa sobre los niveles de RNA del VHC presentado por el PDTC. Se sembraron 5 x 10⁵ células en placas de 100mm. Las células fueron expuestas a una concentración de 5µM de PDTC (6,12 y 24 hrs), Se realizó una extracción de RNA total, luego una RT-PCR y finalmente se evaluaron los niveles de RNA del VHC mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados son la media de 3 experimentos aislados. ANOVA y Dunnett.

Figura 23. Esquema de acción del PDTC basado en los resultados obtenidos

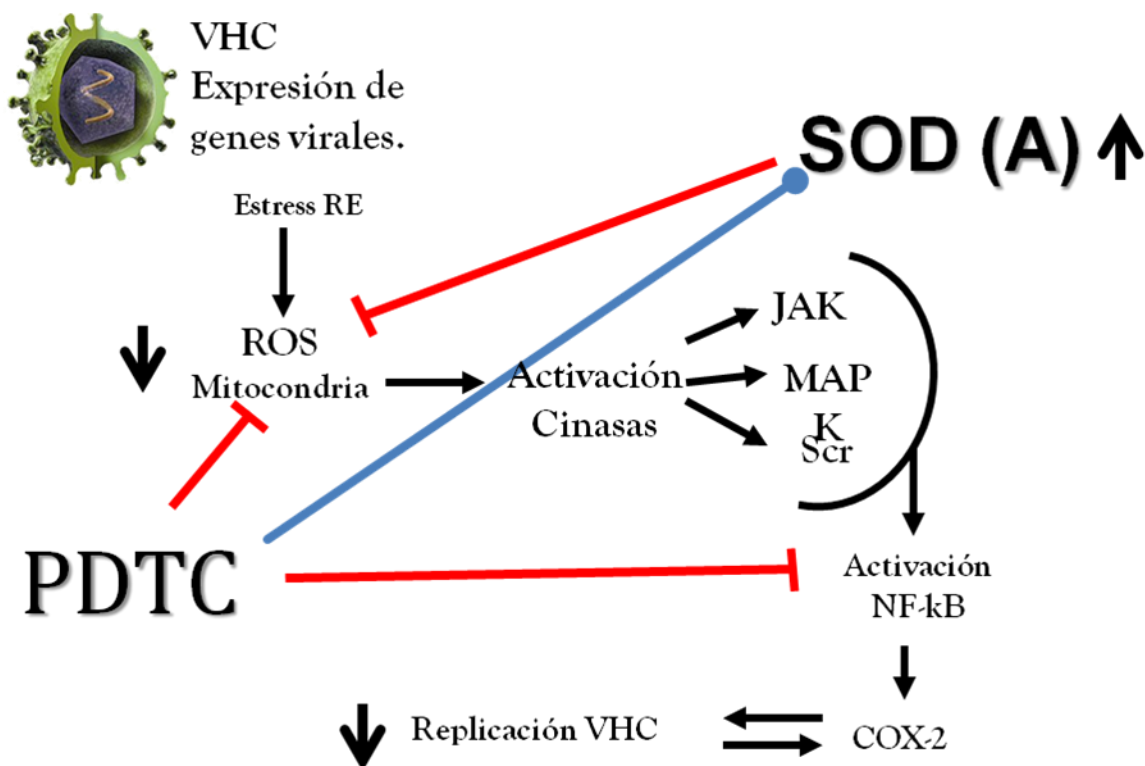


Fig. 23. El PDTC tiene propiedades antioxidantes y antivirales. El PDTC un antioxidante, redujo los niveles de proteínas y lípidos oxidados, sin embargo tuvo un efecto inesperado al aumentar los niveles de la enzima antioxidante Superóxido Dismutasa y aun más presentó un efecto antiviral sobre el VHC.



CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

La Hepatitis C representa un importante problema de salud a nivel mundial. Existe un significativo número de personas infectadas con el virus (170 millones a nivel mundial) y más preocupante aún, es el gran número de casos, que por no presentar síntomas, aún no conoce de su existencia.

Diversos factores han frenado el avance de las investigaciones en cuanto a la búsqueda de terapias más efectivas para tratar la enfermedad, como lo son, la lenta progresión de la infección, la frecuente asintomatología de la enfermedad, el carácter persistente de la infección dado por la evasividad que posee el virus para eludir el sistema inmunológico, por su alta tasa de mutación; la falta de un modelo in vivo de replicación eficiente, ya que el único modelo in vivo en el que se ha logrado una replicación productiva del VHC es el Chimpancé, sin embargo a pesar no es factible el uso a gran escala, por los lineamientos de ética y ecología. Existen otros modelos animales en fase de experimentación como lo son la musaraña y el modelo murino de ratones transgénicos. La terapia existente actualmente para tratar la infección (interferón alfa junto con Rivabirina), solo funciona en aproximadamente un 50% de los casos y es relativamente costosa. Por estas razones es necesaria una nueva y mejor terapia antiviral.

Entre los mecanismos de patogenicidad del virus se describe la inducción de estrés del retículo endoplásmico. Este a su vez, incrementa los niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (RO's), provocando pérdida de la homeostasis del estado oxidativo celular. Con el consecuente daño a proteínas, lípidos y al ADN. Se han reportado niveles de RO's hasta 5 veces más elevadas en células que expresan las proteínas no estructurales del VHC en comparación con células no infectadas.

Por otra parte el AAS, el fármaco más utilizado a nivel mundial, posee múltiples virtudes, entre las cuales su efecto antiinflamatorio es una de las más conocidas. Existen reportes de que el AAS tiene efectos antivirales sobre ciertos flavivirus (Dengue y Virus de la Encefalitis Japonesa), y en estudios anteriores en



nuestro laboratorio se reportó este efecto antiviral sobre el VHC. En este trabajo se confirma este reporte ya que el AAS presentó un efecto de reducción de los niveles de RNA del VHC en las células tratadas. Existe otra propiedad del AAS no muy conocida en la actualidad, en un estudio realizado en 2003 en Uruguay se reportó que el tratamiento con Aspirina reducía los niveles de estrés oxidativo. Esta propiedad antioxidante del AAS no está muy documentada. En este trabajo observamos que el AAS presentó propiedades antioxidantes ya que redujo los niveles de proteínas y lípidos oxidados. Más aun se observó un efecto de regulación positiva en los niveles de la enzima Superóxido Dismutasa al tratar las células con 4 mM de AAS, datos no reportados en la literatura.

El PDTC es un antioxidante ampliamente utilizado en investigación. En reportes anteriores se le han atribuido propiedades antivirales contra el Virus de la Influenza y también se ha reportado un efecto inhibitorio sobre el NF- κ B. En este trabajo confirmamos, bajo nuestras condiciones, el efecto antioxidante del PDTC y además reportamos un efecto antiviral sobre el VHC en la línea celular Huh-7 Replicón. No conocemos a ciencia cierta mediante que mecanismo(s) el PDTC ejerce este efecto pero dado que su efecto es muy similar al observado al tratar las células con AAS y ya que estos dos fármacos no guardan similitudes en su estructura química se presume que la propiedad antioxidante que ambos comparten es la que media su efecto antiviral sobre el VHC; y más aún observando que tanto el efecto antioxidante como el antiviral ocurren simultáneamente es lógico pensar en la existencia de una relación directa entre ambos fenómenos.



CAPÍTULO VII

COCLUSIONES

- La expresión de los genes del **VHC** en la línea celular Huh-7 replicón, induce una elevación en los niveles de **RO's**, lo cual se refleja en el aumento de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas.
- Se demostraron las propiedades antioxidantes del **AAS** ya que al tratar las células Huh-7 (parentales y replicón) con **4mM AAS** se redujeron los niveles de proteínas oxidadas (57%) y lípidos oxidados (45%)
- También se corroboró el efecto antiviral del **AAS** al reducir los niveles de expresión de las proteínas del **VHC** (55%) en las células tratadas.
- Así mismo el tratamiento con **AAS**, aumentó la **actividad de la proteína SOD (39%)** la cual forma parte de los mecanismos celulares antioxidantes, cuya acción resulta en una disminución del **estrés oxidativo (RO's)**.
- Al observarse simultáneamente el efecto antiviral así como el efecto antioxidante del **AAS** se presume que estos eventos guardan relación entre si. Es decir que las propiedades antioxidantes del **AAS** están involucradas de alguna manera con su efecto antiviral.
- El tratamiento de las células Huh-7 (parentales y replicón) con 5uM de **PDTC**, redujo los niveles de lípidos oxidados, proteínas oxidadas y del RNA del **VHC**; así como aumentó la actividad de **SOD**. Estos resultados son similares a los obtenidos con el tratamiento con **AAS**, sugiriendo que las propiedades antioxidantes del **AAS** son las que median su actividad antiviral sobre el **VHC**.



CAPÍTULO VIII

PERSPECTIVAS

- Realizar un estudio clínico para evaluar el efecto del AAS en los niveles de RNA viral, en pacientes VHC positivos. También evaluar conjuntamente los niveles de especies reactivas de oxígeno y su relación con este efecto regulador.
- Evaluar los niveles de expresión de la enzima Superóxido Dismutasa y su actividad simultáneamente para entender mejor el efecto regulador del AAS sobre esta enzima.



CAPÍTULO IX

REFERENCIAS

1. Forns X, and Bukh J. The Molecular Biology of Hepatitis C. Clinics in Liver Disease 3(4), 1999
2. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations for Prevention and Control of Hepatitis C Virus (HCV) Infection and HCV-Related Chronic Disease. CDC MMWR 47, 1998.
3. [Division of Viral Hepatitis, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention](#), Diciembre 8, 2006.
4. 2004, Revista española de Economía de la Salud.
5. Chiquete et al, 2005, La hepatología Molecular un enfoque multidisciplinario, Virus de la Hepatitis C.
6. JENNIFER A. CUTHBERT, CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Oct. 1994, p. 505-532, 0893-8512/94/\$04.00+0. Copyright © 1994, American Society for Microbiology, Hepatitis C: Progress and Problems.
7. Vera De León L y cols., Rev Gastroenterol Mex, Vol. 70, Núm. 1, 2005
8. Rivas -Estilla AM, Panduro A. (Molecular Mechanism of the hepatitis C virus, potential therapeutic targets). Rev Invest Clin 2003;55:51-64.
9. Mc Hutchintson JG, Poynard T. Combination therapy with Interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. Semin Liver Dis 1999;19 Suppl 1:57-65.
10. Penin F, Dibuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. Hepatology 2004; 39:5-19.
11. Bartenschlager R, Lohman V. Novel cell cultura systems for the hepatitis C virus. Antiviral Res 2001; 52:1-17.
12. Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimoto K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kB activation. J Virol 1999;73:13-20.
13. Lohman V, Korner F, Kpach J, Herian U, Theilman L, Bartenschlager R. replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 1999;285:110-3.
14. Rivas-Estilla AM, Svitkin Y, Lopez Lastra M, Hatzoglou M, Sherker A, Koromilas AE. PKR-dependent mechanism of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. J Virol 2002;76:10637-53.
15. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. Clin Microbiol Rev 2000;13:223-35.
16. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of the hepatitis C virus. J Gen Virol 2000;81:1631-48.



17. Liao CL, Lin YL, Wu BC, Tsao CH, Wang MC, Liu CI, Huang YL, Chen JH, Wang JP, Chen LK. Salicylates inhibit flavivirus replication independently of blocking nuclear factor kappa B activation. *J Virol* 2001;75:7828-39.
18. Sanderson S, Emery J, Baglin T, Kinmonth AL. Narrative review: aspirin resistance and its clinical implication. *Ann Intern Med* 2005;142:370-80.
19. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52.
20. Lindenbach BD, 2001, *Fields Virology*.
21. Keith D. Tardif, *TRENDS in Microbiology* vol. 13 N°4, April 2005
22. Ishtiaq Qadri, *Biochem*, 2004
23. Rodríguez Perón, *Rev Cubana Med Milit* 2001; 30(1): 36-44
24. Trujillo Murillo Et al, (*J of Viral Hepatitis*) 2006
25. CHING-LEN LIAO,^{1*} YI-LING LIN,^{1,2} BI-CHING WU, *JOURNAL OF VIROLOGY*, Sept. 2001
26. Noticia publicada en *El Observador* el 30 de mayo de 2001
27. Ernst Peterhans, Institute of Veterinary Virology, University of Berne, CH-3012 Berne, Switzerland, *Oxidants and Antioxidants in Viral Diseases: Disease Mechanisms and Metabolic Regulation*, 1997
28. Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J Virol* 2005;79:9725-34.
29. Iñiguez MA, Martínez- Martínez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 2000;275:23637-35.
30. Igor Mazur,¹ Walter J. Wurzer, Christina Ehrhardt, Stephan Pleschka, Pilaipan Puthavathana, Tobias Silberzahn, Thorsten Wolff, Oliver Planz and Stephan Ludwig, *Cellular Microbiology* (2007) doi:10.1111/j.1462-5822.2007.009022
31. Görenek Levent, Acar Alil, Aydın Ahmet, Eyigun Can Polat¹, Çetinkaya Aytaç, Eken Ays, and Sayal Ahmet, Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy, *Journal of Translational medicine*, 2006.
32. Jay H. Hoofnagle, M.D., and Leonard B. Seeff, M.D., Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C, *The new england journal of medicine*, n engl j med 355;23 www.nejm.org december 7, 2006
33. Noboru Uchide, Kunio Ohyama, Antiviral function of pyrrolidine dithiocarbamate against influenza virus: the inhibition of viral gene replication and transcription, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2003) 52, 8–10.



34. Salvatore Cuzzocrea, Prabal K. Chatterjee, Emanuela Mazzon, Laura Dugo, Ivana Serraino, Domenico Britti, Christoph Thiernemann,. Pyrrolidine dithiocarbam, British Journal of Pharmacology (2002) 135, 496 ± 510.



CAPÍTULO X

ANEXOS

ANEXO 1. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS MÉTODO DE BRADFORD MICROENSAYO (1 ml)

FUNDAMENTO

Se determina la concentración de proteína soluble a través del agregado de un colorante ácido a la solución de proteínas y su posterior lectura de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. El colorante Azul de Coomassie se une a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas (principalmente arginina).

MATERIAL

- Estándar de Albúmina Serica Bovina (BSA) de 100 mg/ml
- Celdas de plástico marca Daigger #NX6806A
- Extractos de Proteínas
- Reactivo de Bradford marca BIO-RAD #500-0006, 450 ml

PROTOCOLO

1. Preparar en agua estéril una solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a una concentración de 100 mg/ml.
2. Hacer una dilución de 1:50 del stock de 100 mg/ml, para que quede a una concentración final de 2 mg/ml ó 2 µg/µl.
3. Preparar directamente en las celdas de plástico los siguientes estándares empleando el stock diluido de BSA:



Estándar	μl del estándar de 2 mg/ ml	μl del agua	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1	0	800	0
2	1	799	2
3	2.5	797.5	5
4	5	795	10
5	7.5	792.5	15

ar 200 μl del reactivo de Bradford concentrado a cada celda y mezclar.

5. Incubar las celdas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las absorbancias aumentan con el tiempo de incubación, por lo que **no** se recomienda incubar las muestras por más de una hora.
6. Medir absorbancia a 595 nm en el biofotómetro (Eppendorf).

OBSERVACIONES

- Para determinar la concentración de proteínas en las muestras problema se colocan 2 μl del extracto de proteínas más 798 μl de agua. La concentración que se obtenga en $\mu\text{g}/\text{ml}$ se divide entre dos, ya que se utilizaron 2 μl de cada una. La concentración se reporta en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- En el biofotómetro se colocan las unidades de $\mu\text{g}/\text{ml}$ y regresión no lineal.
- La linealidad del método es de 1 – 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

ANEXO 2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

MATERIAL

- Cultivos celulares
- Buffer de lisis 1X
- Tableta de inhibidores de proteasas marca Roche #1697498
- Escrapers de 25cm marca Corning #3010, 100 piezas



EQUIPO

- Centrífuga refrigerada

PROTOCOLO

1. Retirar el medio de cultivo y lavar las células con PBS 1X (en caso de que las células no estén muy maltratadas).
2. Adicionar 1 ml de PBS 1X + EDTA 1 mM a cada placa de 35 x 10 mm y despegarlas con ayuda de un escrapper.
3. Colocar las células en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 4°C por 10 segundos (spin).
4. Retirar el sobrenadante y agregar a la pastilla celular 10 volúmenes de buffer de lisis 1X frío (para células provenientes de una placa de 35 x 10mm se agrega 30 µl de buffer). Se puede adicionar hasta 250 µl del buffer de lisis 1X completo.
5. Incubar en hielo por 20 minutos.
6. Centrifugar a 13,000 rpm por 5-10 minutos a 4°C.
7. Remover el sobrenadante y colocarlo en un tubo eppendorf nuevo y descartar la pastilla.
8. Cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford.
9. Almacenar los extractos de proteínas a -70°C por tiempo indefinido o a -20°C a corto plazo.

OBSERVACIONES

- El PBS 1X + EDTA 1mM se utiliza para despegar las células que crecen en monocapa. En el caso de células en suspensión únicamente se empastillan por centrifugación.
- En las placas de 100 x 20 mm se utilizan 2 ml del buffer PBS 1X + EDTA 1mM y se empastillan a 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
- Si la confluencia celular es menor del 30% se utilizan 20 µl de buffer de lisis, si la confluencia es de aproximadamente entre 50-60% se utilizan de 40 a 60 µl de buffer, si la confluencia es del 100% o superior se emplean de 200 a 250 µl de buffer, respectivamente.
- El buffer de lisis completo 1X es estable hasta por 2 semanas.



SOLUCIONES

1. PBS 10X

Reactivos	Cantidad	[Final]
NaCl	80 g	8%
KCl	2 g	0.2%
Na ₂ HPO ₄	14.4 g	1.44%
KH ₂ PO ₄	2.4 g	0.24%

Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 litro con agua destilada

2. PBS 1X + EDTA 1 mM

[Inicial]	Cantidad	[Final]
PBS 10X	10 ml	1X
EDTA 0.5 M pH 8.0	200µl	1 mM

Ajustar a 100 ml con agua destilada

3. Buffer de lisis 5X

[Inicial]	Cantidad	[Final]
Triton X-100 100%	5 ml	5%
Tris-HCl 1 M pH 7.5	5 ml	50 mM
KCl 2 M	12.5 ml	250 mM
MgCl ₂ 1 M	1 ml	10 mM

Aforar a 100 ml con agua destilada

4. Tris-HCL pH 7.5 1M

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris	12.11 g	1M

Ajustar a pH 7.5 con HCl y aforar a 100ml con agua destilada



5. KCl 2M

Reactivos	Cantidad	[Final]
KCl	14.91 g	2M

Aforar a 100ml con agua destilada

6. MgCl₂ 1M

Reactivos	Cantidad	[Final]
MgCl ₂	4.76 g	1M

Aforar a 50ml con agua destilada

7. Soluciones stock de Inhibidores de Proteasas

Reactivos	[Inicial]
Aprotinina	10 mg/ml
Leupeptina	10 mg/ml
Pepstatina	1 mg/ml
Ditiotritol (DTT)	0.1 M
Fluoruro de Sodio	500 mM
Vanadato de Sodio	100 mM
Microcistina	0.4 mM
Ácido okadaico	100 μM
Tableta de Inhibidores de proteasas	1 tableta en 1 ml de agua

8. PMSF 0.5 M

Reactivo	Cantidad
PMSF	0.0871 g



Aforar a 1 ml con isopropanol

9. Buffer de Lisis Completo 1X (solución de trabajo)

Reactivos	Cantidad
Buffer de lisis 5X	2 ml
Stock de Aprotinina	3 μ l
Stock de Leupeptina	1 μ l
Stock de Pepstatina	10 μ l
Stock de Ditionitro (DTT)	10 μ l
Stock de Fluoruro de Sodio	1 ml
Stock de Vanadato de Sodio	10 μ l
Stock de Microcistina	6.25 μ l
Stock de Ácido okadaico	0.5 μ l
Stock de Inhibidores de proteasas	400 μ l
PMSF 0.5 M	10 μ L

Aforar a 10 ml con agua destilada

ANEXO 3. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

FUNDAMENTO

Fue descrito por Laemmli en 1970. Las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas en base a su tamaño.



MATERIAL

- Preparar hoja de trabajo
- Muestras cuantificadas y desnaturalizadas
- Soluciones para preparar el gel de poliacrilamida

EQUIPO

- Cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN 3 Cell marca BIO-RAD #165-3322
- Fuente de poder

PROTOCOLO

1. Ensamblar el cassette del gel conforme a las especificaciones de la compañía BIO-RAD (Mini-Protean 3 Cell).
2. Preparar la solución del gel separador (separating gel) con la concentración apropiada de acrilamida.
3. Aplicar con una pipeta serológica 4.5 ml de la solución del gel separador al vidrio que contiene el separador de 1 mm, y cubrir el gel con Isopropanol absoluto para favorecer la polimerización. Después, de 10 minutos invertir el gel para remover el Isopropanol.
4. Preparar la solución del gel concentrador (stacking gel), vaciarlo hasta el límite del vidrio e inmediatamente colocar el peine.
5. Colocar el gel en la cámara de corrimiento y ensamblarlo para después añadir el buffer de corrida 1X.
6. Retirar el peine y lavar los pocillos con buffer para eliminar la acrilamida que no haya polimerizado.
7. Cargar las muestras que previamente deben ser mezcladas con buffer de desnaturalización en una relación 1:1, y calentarlas a 95°C por 4 minutos.
8. Correr el gel a 80V por aproximadamente 2.5 horas.

SOLUCIONES

**1.**

Reactivos	Cantidad
Acrilamida 30% T	87.6 g (29.2 g/ 100 ml)
Bisacrilamida (N'N'-bis-metilen-acrilamida) 2.67% C	2.4 g (0.8 g/100 ml)

Acrilamida/ Bisacrilamida

Aforar a 300 ml con agua destilada, almacenar a 4°C y protegerla de la luz

2. SDS 10% (w/ v)

Reactivo	Cantidad
SDS	10 g

Aforar a 100 ml con agua destilada. El SDS es tóxico, por lo que se recomienda utilizar cubrebocas para pesarlo y prepararlo.

3. Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris base	27.25 g	1.5 M
SDS	0.6 g	0.4%

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



4. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris base	9 g	0.5 M
SDS	0.6 g	0.4%

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

5. Buffer de Desnaturalización 4x

Reactivo	Cantidad	[Final]
Tris-HCl 1 M pH 6.8	12.50 ml	130 mM
Glicerol	20 ml	20%
SDS 10%	20 ml	2%
Azul de Bromofenol	0.1 g	0.1%
β -mercaptoetanol	1 ml	1%
Volumen Total	53.5 ml	

Diluir las muestras 1:1 con el buffer y calentarlas a 95°C por 4 minutos. Almacenar el buffer de desnaturalización a 4°C.

6. Buffer de Corrida 5X

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris base	15.1 g	125 mM
Glicina	94 g	1.25 M
SDS	5 g	0.5%



Aforar a 1 litro con agua destilada y almacenar a 4°C

7. Persulfato de amonio (PSA) 10%

Reactivo	Cantidad
PSA	100 mg

Disolver en 1 ml de agua destilada y almacenar a -20°C

8. Preparación del Gel de Poliacrilamida (10 ml)

Gel	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	12%	14%	
H₂O	6.1	5.7	5.4	5.1	4.7	4.4	4.1	3.4	2.7	
A/B 30% (ml)		1.3	1.7	2.0	2.3	2.7	3.0	3.3	4.0	4.7
*Buffer (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
SDS 10% (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	
PSA 10% (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
TEMED (μl)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	

*Gel Separador- Tris-HCl pH 8.8 1.5M

*Gel Concentrador- Tris-HCl pH 6.8 0.5M

Las cantidades de PSA y TEMED deben ser ajustadas dependiendo del volumen de gel que se prepara.



ANEXO 4. TINCIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA AZUL DE COOMASSIE

MATERIAL

- Solución de Tinción
- Solución para desteñir
- Plástico adherente (saran wrap)

PROTOCOLO

1. Teñir el gel de poliacrilamida con la solución de azul de coomassie durante 30 minutos.
2. Desteñir el gel por 30 minutos o toda la noche con varios cambios de solución para desteñir.

SOLUCIONES

1. Solución de Tinción

Reactivos	Cantidad	[Final]
Metanol	100 ml	50%
Ácido acético glacial	14 ml	7%
Azul de Coomassie R-250	0.1 g	0.05%

Aforar a 200 ml con agua destilada

2. Solución para desteñir



Reactivos	Cantidad	[Final]
Metanol	66 ml	16.5%
Ácido acético glacial	20 ml	5%

Aforar a 400 ml con agua destilada

ANEXO 5. TRANSFERENCIA DEL GEL A LA MEMBRANA

(Western Transfer)

MATERIAL

- Papel filtro cortado
- Membrana Hybond-P PVDF marca Amersham Biosciences #RPN303F
- Pipeta rolling
- Buffer de transferencia 1X helado
- Tijeras
- Set de transferencia
- Hoja para bisturí

EQUIPO

- Placa de agitación
- Agitador magnético
- Fuente de poder

- Pinzas

PROTOCOLO

1. Recortar la membrana Hybond-P PVDF (Amersham Biosciences) con las dimensiones de 6.0 cm de largo x 8 cm de largo.
2. Sumergir la membrana en metanol 100% (v/v) por 5 minutos.
3. Lavar la membrana con agua destilada por 5 minutos y equilibrar la membrana con buffer de transferencia 1X durante 10 minutos. Colocar también en el buffer de transferencia dos piezas de papel filtro.
4. Remover y descartar el gel concentrador (stacking gel).
5. Colocar sobre el gel un papel filtro húmedo y despegar el gel del vidrio. Colocarlo sobre la esponja del set de transferencia.
6. Armar el sándwich colocando sobre el gel la membrana previamente equilibrada. Eliminar burbujas con la pipeta rolling.
7. Colocar un papel filtro humedecido sobre la membrana, y enseguida colocar la otra esponja (ver figura 1).
8. Transferir a 4°C a 100V durante 1 hora, ó a 50V por 3 h ó a 35V toda la noche.

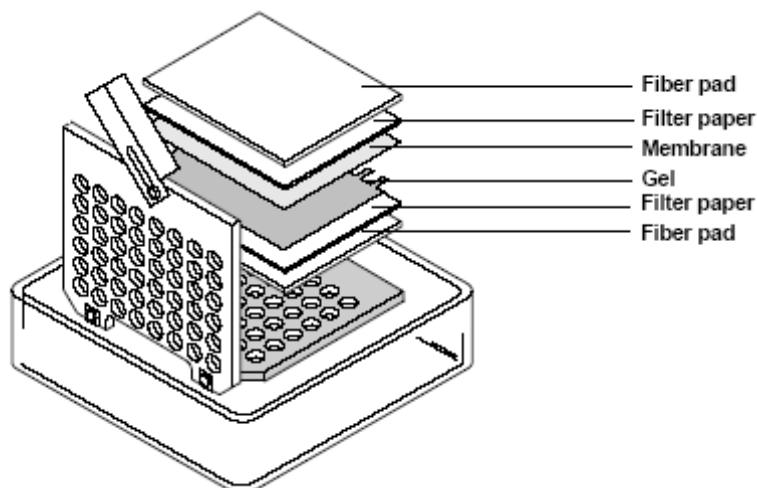




Figura 1. Esquema del Sándwich de transferencia

SOLUCIONES

1. Buffer de Transferencia 5X

Reactivos	Cantidad
Glicina	14.5 g
Tris base	29 g
Metanol	200 ml

Aforar a 1 litro con agua destilada. Almacenar a 4°C

OBSERVACIONES

- Evitar dejar burbujas para que no se formen gradientes en la transferencia.
- La transferencia se efectúa en cuarto frío y con agitación.
- El buffer de transferencia se utiliza a 1X y debe estar frío.
- No olvidar congelar el ice que se coloca en la cámara de transferencia.



ANEXO 6. WESTERN BLOT

MATERIAL

- Buffer de bloqueo Plástico adherente
- Anticuerpos diluidos Leche descremada en polvo
- Amresco #0860 Albúmina sérica bovina
- Buffer de lavados PBS-T

EQUIPO

- Placa de agitación
- Pinzas

PROTOCOLO

1. Después de la transferencia teñir la membrana con el reactivo rojo de Ponceau durante 5 minutos
2. Enjuagar la membrana teñida 3 veces con buffer PBS-T 1X, y marcar con lápiz los pesos moleculares del marcador.
3. Sumergir la membrana en el buffer de bloqueo 1X a 4°C durante 1h o toda la noche con agitación.
4. Posteriormente, lavar la membrana 2 veces con PBST 1X por 10 minutos cada uno de los lavados a temperatura ambiente.
5. Incubar la membrana con el anticuerpo primario (1:1000) toda la noche a 4°C y con agitación.
6. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
7. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario (1:1000) por 2h a 4°C y con agitación.
8. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
9. Al terminar los lavados preparar el material necesario para efectuar el desarrollo de Quimioluminiscencia.



SOLUCIONES

1. PBS 10X

Reactivos	Cantidad	[Final]
NaCl	80 g	8%
KCl	2 g	0.2%
Na ₂ HPO ₄	14.4 g	1.44%
KH ₂ PO ₄	2.4 g	0.24%

Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 Litro con agua destilada

2. Buffer de Bloqueo con LECHE

Reactivos	Cantidad
Leche descremada en polvo	1.2 g
PBS 10X	4 ml
Triton X-100 100%	0.2 ml
Ácida de Sodio (NaN ₃) 2%	0.4 ml

Aforar a 40 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

2. Buffer de Bloqueo con ÁLBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Reactivos	Cantidad
BSA	1.5 g
PBS 10X	3 ml



Triton X-100 100%	30 μ l
-------------------	------------

Aforar a 30 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

3. Buffer de lavados PBS-T 1X para LECHE

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	40 ml
Triton X-100 100%	2 ml

Aforar a 400 ml con agua destilada

3. Buffer de lavados PBS-T 1X para BSA

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	40 ml
Triton X-100 100%	0.4 ml

Aforar a 400 ml con agua destilada

4. Solución de Ponceau 0.1%

Reactivos	Cantidad
-----------	----------



Ponceau S	0.2 g
Ácido acético	10 ml

Aforar a 200 ml con agua destilada

4. Anticuerpo dilución 1:1000 con LECHE

Reactivos	Cantidad
Anticuerpo	10 μ l
Buffer de Bloqueo con LECHE	10 ml

5. Anticuerpo dilución 1:1000 con BSA

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	1 ml
BSA 1%	0.1 ml

Aforar a 10 ml con agua destilada y adicionar 10 μ l del anticuerpo



OBSERVACIONES

- El anticuerpo diluido de 1:1000 se puede almacenar a 4°C para poderlo reutilizar hasta 3 veces.
- Los anticuerpos contra NS5, actina y NPT II se recomiendan prepararlos a una dilución de 1:1000.
- Los lavados son a temperatura ambiente y las incubaciones con los anticuerpos son a 4°C.
- Los anticuerpos se pueden preparar en leche o en BSA.
- La solución de Ponceau se puede reutilizar.



ANEXO 7. QUIMIOLUMINISCENCIA

MATERIAL

- Membrana Hybond-P PVDF marca Amersham Biosciences #RPN303F
- Kit de Quimioluminiscencia marca Amersham Biosciences #RPN2132
- Anticuerpo Monoclonal anti-NS5a marca Biodesign Internacional #C65388M
- Anticuerpo Monoclonal anti-NPT-II marca Cortex Biochem #CR1112RP
- Anticuerpo Monoclonal anti-Actin marca MP Biomedicals #69100
- Anticuerpo Secundario anti-Rabbit marca Promega #W401B
- Anticuerpo Secundario anti-Mouse marca Promega #W402B
- Tijeras, plástico adherente, pinzas

EQUIPO

- Chasis
- Revelador automático

PROTOCOLO

1. Preparar la solución de detección mezclando la solución A y B del kit de Quimioluminiscencia en una relación 1:1. La cantidad requerida de esta mezcla es 0.1 ml/cm² de membrana.
2. Eliminar el buffer de lavado del recipiente que contiene a la membrana y colocar la solución de detección sobre la membrana.
3. Incubar la membrana en la solución de detección durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Escurrir la membrana para eliminar el exceso de solución de detección.
5. Colocar la membrana sobre el chasis y sobre ella colocar un pedazo de plástico adherente.
6. Exponer la membrana a la radiografía por segundos o minutos.
7. Colocar la radiografía en el revelador automático.



SOLUCIONES

1. Solución de detección

Reactivos	Cantidad
Solución A	2 ml
Solución B	2 ml

OBSERVACIONES

- Realizar el revelado en el cuarto oscuro.
- El volumen requerido de la mezcla de detección es 0.1ml/cm² de membrana.