

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL HGF EN LA EXPRESIÓN DEL VHC Y SU  
RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

Por

Q.F.B. SONIA AMELIA LOZANO SEPULVEDA

Como requisito parcial para la obtención del Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería  
Genética

Octubre de 2011

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL HGF EN LA  
EXPRESIÓN DEL VHC Y SU RELACIÓN CON EL  
ESTRÉS OXIDATIVO**

Aprobación de la tesis:



---

DRA. C. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA

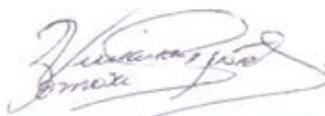
Director de Tesis



---

DRA. C. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIERREZ RUIZ

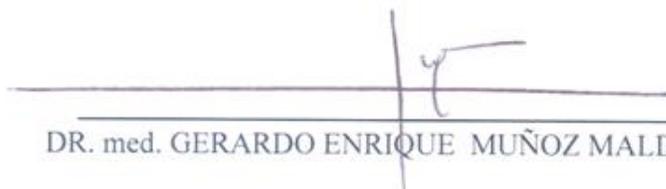
Co-director de tesis



---

DRA. C. VIVIANA CHANTAL ZOMOSA SIGNORET

Co-director de tesis



---

DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

## TABLA DE CONTENIDO

<i>INDICE DE FIGURAS</i>	IV
<i>INDICE DE TABLAS</i>	VI
<i>INDICE DE GRÁFICAS</i>	VI
<i>ABREVIATURAS</i>	VIII
<i>RESUMEN</i>	IX
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Epidemiología de la Hepatitis C	1
1.2 Historia Natural de la Hepatitis C	3
1.3 Factores de Riesgo y Vías de Transmisión	4
1.4 Diseños Experimentales para el Desarrollo de Vacunas	4
1.5 Tratamientos Disponibles	6
1.6 Biología Molecular del Virus de la Hepatitis C	11
1.7 Estrés Oxidativo y Replicación Viral	14
1.8 Modelo de Replicón Subgenómico VHC	17
1.9 Factor de Crecimiento de Hepatocitos	19
II. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES	24

III.	JUSTIFICACIÓN	31
IV.	OBJETIVOS	
4.1	Objetivo General	32
4.2	Objetivos Específicos	32
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1	Reactivos	33
5.2	Equipos	35
5.3	Líneas Celulares	35
5.4	Conteo Celular con Azul de Tripano y Siembra en Placa	36
5.5	Tratamiento con HGF	37
5.6	Expresión de RNA y Proteínas Virales de VHC	38
5.6.1	Extracción de RNA Total	38
5.6.2	Cuantificación Relativa del RNA de VHC	39
5.6.3	Extracción de Proteínas y Cuantificación por Bradford	39
5.6.4	Western Blot de la Proteína Viral NS5A	40
5.7	Medición de Marcadores de Estrés Oxidativo	
5.7.1	Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno	42
5.7.2	Determinación de Proteínas Oxidadas	42
5.7.3	Determinación del Nivel Proteico de SOD-1, SOD-2 y Catalasa	43

5.8 Análisis de Datos	44
VI. RESULTADOS	
6.1 Ensayo de Viabilidad Celular	45
6.2 Cuantificación del RNA del VHC por PCR en Tiempo Real	46
6.3 Evaluación del Efecto del HGF sobre los Niveles de Expresión de la Proteína Viral NS5A	50
6.4 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno	52
6.5 Determinación de Proteínas Oxidadas Totales	54
6.6 Nivel de proteínas antioxidantes SOD-1, SOD-2 y Catalasa	57
VII. DISCUSIÓN	64
VIII. CONCLUSIONES	70
IX. PERSPECTIVAS	71
X. REFERENCIAS	72
XI. ANEXOS	76
Resumen Bibliográfico	

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de la población infectada con el VHC hasta el 2007	2
<b>Figura 2.</b> Historia Natural de la Hepatitis C	3
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción del interferón	7
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de acción de la ribavirina	8
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de inducción de ROS por el VHC	16
<b>Figura 6.</b> Estructura esquemática del receptor de HGF, cMet, y la actividad biológica de HGF	21
<b>Figura 7.</b> Vías de transducción de señales desencadenadas por HGF/c-Met	23
<b>Figura 8.</b> Los hepatocitos Met-KO están sujetos a estrés oxidativo	26
<b>Figura 9.</b> Expresión de proteínas antioxidantes	27
<b>Figura 10.</b> Efecto del HGF en la acumulación de ROS	28
<b>Figura 11.</b> Niveles de HGF en suero de pacientes sin patología renal (WRD) y de pacientes sometidos a tratamiento con diálisis regulares (RDT)	29
<b>Figura 12.</b> Esquema general de tratamiento con HGF	38
<b>Figura 13.</b> Western blot de la proteína viral NS5A	51

<b>Figura 14.</b> Oxiblot de células Huh-7 parental en presencia y ausencia de HGF 50 ng/mL	54
<b>Figura 15.</b> Oxiblot de células Huh-7 replicón en presencia y ausencia de HGF 50 ng/mL	55
<b>Figura 16.</b> Western blot de la proteína antioxidante SOD-1 para células Huh-7 parental	58
<b>Figura 17.</b> Western blot de la proteína antioxidante SOD-1 para células Huh-7 replicón	59
<b>Figura 18.</b> Western blot de la proteína antioxidante SOD-2 para células Huh-7 parental	60
<b>Figura 19.</b> Western blot de la proteína antioxidante SOD-2 para células Huh-7 replicón	61
<b>Figura 20.</b> Western blot de la proteína antioxidante catalasa para células Huh-7 parental.	62
<b>Figura 21.</b> Western blot de la proteína antioxidante catalasa para células Huh-7 replicón.	63

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nuevas drogas dirigidas específicamente contra VHC	10
<b>Tabla 2.</b> Principales antioxidantes, su ubicación y su función	17
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de cDNA del ensayo de RT-PCR	47
<b>Tabla 4.</b> Valores promedio de Ct de la cuantificación del RNA del VHC	48
<b>Tabla 5.</b> Valores promedio de Ct de la cuantificación de $\beta$ -actina	48

## INDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Viabilidad celular	46
<b>Gráfica 2.</b> Cuantificación relativa de RNA de VHC medida por PCR en tiempo real utilizando $\beta$ -actina como gen normalizador	49
<b>Gráfica 3.</b> Curva de calibración de Bradford	50
<b>Gráfica 4.</b> Análisis densitométrico del triplicado del western blot de la proteína viral NS5A	51
<b>Gráfica 5.</b> Determinación de ROS en células Huh-7 parental	52
<b>Gráfica 6.</b> Determinación de ROS en células Huh-7 replicón	53
<b>Gráfica 7.</b> Análisis densitométrico del triplicado de oxiblots realizado para la línea celular Huh-7 parental	55
<b>Gráfica 8.</b> Análisis densitométrico del triplicado de oxiblots realizado para la línea celular Huh-7 replicón	56

<b>Gráfica 9.</b> Análisis densitométrico del nivel de la proteína SOD-1 en células Huh-7 parental	58
<b>Gráfica 10.</b> Análisis densitométrico del nivel de la proteína SOD-1 en células Huh-7 replicón	59
<b>Gráfica 11.</b> Análisis densitométrico del nivel de la proteína SOD-2 en células Huh-7 parental	60
<b>Gráfica 12.</b> Análisis densitométrico del nivel de la proteína SOD-2 en células Huh-7 replicón	61
<b>Gráfica 13.</b> Análisis densitométrico del nivel de la proteína Catalasa en células Huh-7 parental	62
<b>Gráfica 14.</b> Análisis densitométrico del nivel de la proteína Catalasa en células Huh-7 replicón	63

## ABREVIATURAS

ARN = Ácido ribonucleico

ADNc = Ácido desoxirribonucleico complementario

VHC = Virus de la Hepatitis C

HGF = Factor de Crecimiento de Hepatocitos

PCR = Reacción en cadena de la Polimerasa

qRT-PCR= Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa en Tiempo Real

RT-PCR = Reacción en cadena de la Polimerasa de Transcriptasa inversa

°C = Grados Centígrados

µl = microlitros

mL = mililitros

l = litro

g = gramos

mg = miligramos

M = Molar

mM = milimolar

µM = micromolar

Fw= Forward

Rv= Reverse

## RESUMEN

**Presenta:** Q.F.B Sonia Amelia Lozano Sepúlveda  
2010

**Fecha de graduación:** Octubre

**Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.  
Facultad de Medicina.**

**Título del Estudio:** Evaluación del efecto del HGF en la Expresión del VHC y su Relación con el Estrés Oxidativo.

**Número de páginas:** 103

**Introducción y objetivo.** La infección con el virus de la hepatitis C (VHC) es una de las causas más importantes de hepatopatía crónica en el mundo. El estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la infección crónica por VHC. Se ha reportado que la replicación del VHC puede ser modificada mediante la modulación del estrés oxidativo en la célula. Se sabe que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) modula los niveles de estrés oxidativo en líneas celulares de hepatoma humano, disminuyendo los niveles de especies reactivas de oxígeno e interviniendo directamente en los niveles de glutatión reducido en la célula. Existen reportes relacionados con pacientes infectados con el VHC sometidos a hemodiálisis, en donde se demuestra que al terminar el protocolo de hemodiálisis hay una disminución significativa de la carga viral acompañada de niveles altos de HGF en sangre.

**Objetivo:** Evaluar el efecto del HGF en la expresión del VHC utilizando un modelo de replicones subgenómicos y su relación con el estrés oxidativo. **Material y métodos.** Células de hepatoma humano parental y VHC-replicón fueron expuestas a 50 ng/mL de HGF a diferentes tiempos (0-72 horas). Se evaluó la viabilidad celular a diferentes concentraciones de HGF (20-100 ng/mL) por medio de Alamar azul. Se realizaron extracciones de RNA y proteínas totales. Se sintetizó el cDNA a partir del RNA por retrotranscripción y se amplificó un fragmento del genoma del VHC para evaluar su expresión por PCR en tiempo real. Se realizó un western blot para medir la expresión de la proteína viral NS5A, además de la expresión de las proteínas antioxidantes Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y catalasa. Se midieron las proteínas oxidadas por medio de Oxiblot y se determinó el nivel de especies reactivas de oxígeno por el método de la DHCF. Se analizaron los resultados. **Resultados.** Los niveles de RNA del VHC disminuyeron en un 10% a las 6h y 12h post- tratamiento, respecto a su control sin tratamiento. Al tiempo de 24h, se obtuvo una disminución del 50% aproximadamente en comparación al control; sin embargo, a las 48h y 72h la expresión del VHC es similar a los controles. A nivel traduccional, se observó una tendencia de disminución del nivel de NS5A; sin embargo, no fue estadísticamente significativa. Los niveles de ROS no se ven disminuidos en las células al ser tratadas con el HGF. El índice de proteínas oxidadas se ve disminuido, en las dos líneas celulares, siendo estadísticamente significativa, a las 72 horas post-tratamiento. La expresión de las enzimas Cu/Zn SOD, MnSOD y catalasa, en el caso de las células replicón, no presentan ningún cambio en su expresión; en el caso de las células parental, se observa un aumento con respecto al tiempo de la expresión de las enzimas evaluadas. La viabilidad celular se mantiene entre 100-70% durante los diferentes tiempos de tratamiento. **Conclusiones.** El HGF disminuye los niveles de RNA viral a nivel transcripcional, posiblemente el HGF participe en la desestabilización del RNA viral induciendo su posterior degradación. Tal vez exista una correlación entre el estrés oxidativo celular y la expresión viral; debido a que hubo una disminución en el nivel total de proteínas oxidadas. El mecanismo es independiente de la acción de Cu/Zn SOD, Mn SOD y catalasa. La elucidación de la vía de señalización del HGF puede ser clave para el diseño de nuevos agentes antivirales.

---

Dra. Ana Maria Guadalupe Rivas Estilla

Director de Tesis

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Epidemiología de la Hepatitis C**

La hepatitis C es un problema de salud global causado por la infección con el virus de la hepatitis C (VHC). Aunque no se encuentran disponibles datos de prevalencia representativos de muchos países, los datos disponibles indican que aproximadamente el 3% de la población mundial está infectada con el VHC. Se estima que alrededor de 170 millones de personas en todo el mundo se encuentran crónicamente infectados con este virus[1]. En países en desarrollo, la transmisión nosocomial de nuevas infecciones de VHC es el mayor problema ya que debido a la reutilización de jeringas contaminadas o esterilizadas inadecuadamente y agujas usadas en procedimientos médicos, paramédicos y dentales[2], con 2.3 -4.7 de nuevas infecciones cada año[3].

En el contexto mundial se describen cuatro niveles epidemiológicos en cuanto a la transmisión de la hepatitis C. Para ello, se utiliza la frecuencia de anticuerpos contra VHC en donadores como indicador, siendo así, un nivel elevado con frecuencias mayores de 5%, el nivel intermedio con frecuencias de 1.1 a 5 %, el nivel bajo con prevalencia de 0.2 a 1 % y el muy bajo con cifras menores a 0.1 %. De acuerdo con esta clasificación, México se encuentra en el nivel epidemiológico bajo[4] (Figura 1).

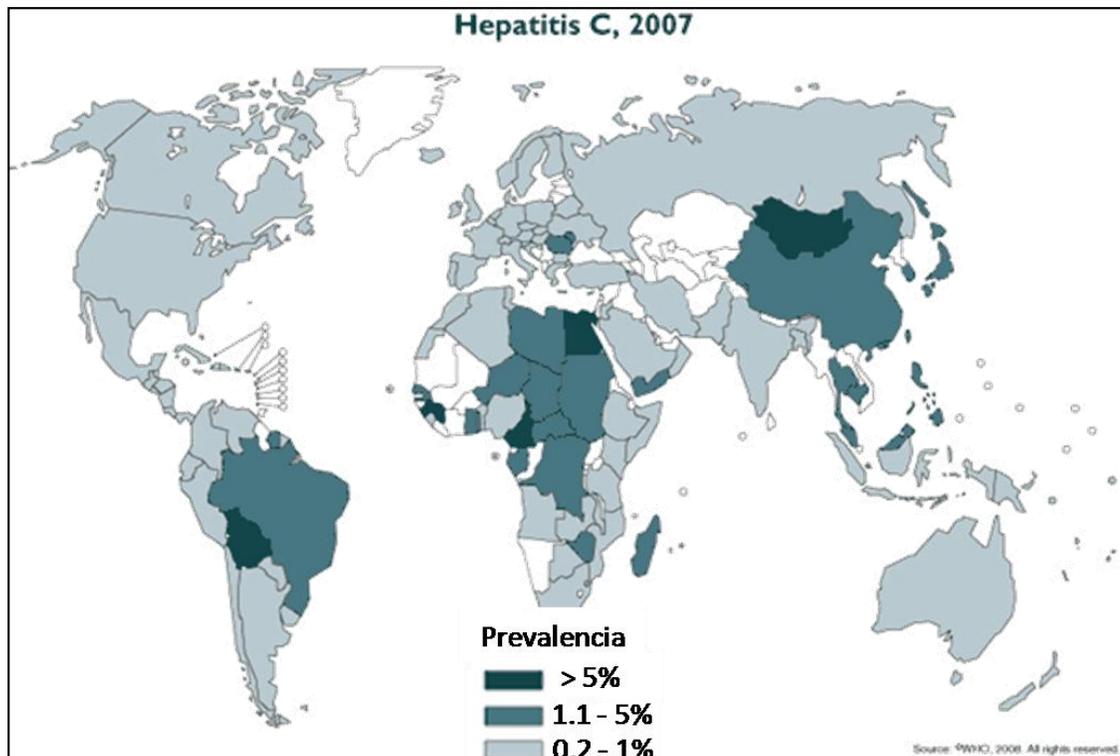


Figura 1. Distribución geográfica de la población infectada con el VHC hasta el 2007.

En México, una encuesta con base poblacional de hepatitis C, indica que hay 700 mil mexicanos infectados mayores de 20 años, y una cuarta parte de los infectados (24.7%) tiene una infección activa. La prevalencia más alta está en las entidades del norte del país con 2 %, seguidas del sur del país con 1.5% y el centro con 1.1 %. Al considerar la evolución natural de la infección puede esperarse que esta enfermedad tenga un elevado peso en este país y represente un problema emergente de salud pública[5].

## 1.2 Historia Natural de la Hepatitis C

La enfermedad comienza con una fase aguda generalmente asintomática, lo que dificulta el diagnóstico a etapas tempranas de la infección. Del total de los infectados, alrededor del 54-86% desarrollan hepatitis C crónica en un periodo de 20 a 30 años. De los individuos en fase crónica, el 17-55% evoluciona a cirrosis hepática, 1-23% desarrollan carcinoma hepatocelular (CHC) y el 4-15 % muere a causa de las afecciones anteriores[5-6]. El CHC está considerado como la 3er causa de muerte por cáncer a nivel mundial debido a su mal pronóstico.[7]. Se sugiere que el desarrollo de la cronicidad depende de la edad a la cual la persona adquiere la infección, es decir, si la infección comienza antes de los 40 años de edad, alrededor del 20 % desarrollarán cirrosis en un periodo de 20 años; por otro lado, si se contrae la enfermedad después de los 40 años, existe un porcentaje mayor, 40%, de infectados que desarrollarán cirrosis en ese periodo[8] (Figura 2).

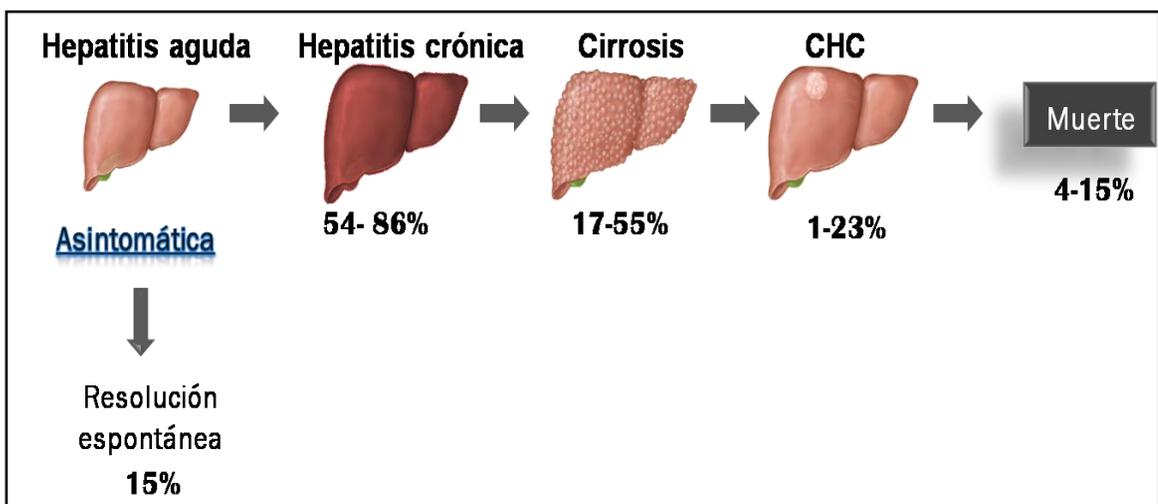


Figura 2. Historia Natural de la Hepatitis C.

### **1.3 Factores de Riesgo y Vías de Transmisión**

La mayoría de las personas infectadas han contraído el virus a través de transfusiones sanguíneas, productos sanguíneos contaminados o material de inyección de drogas contaminado; de manera secundaria, se contrae el virus por las vías, sexual y perinatal[9]. La transfusión sanguínea ha sido una de las principales causas de contagio, ya que, como se sabe, antes de los 90's no se evaluaba la presencia del virus en los donadores; sin embargo, actualmente la transmisión de este tipo ha disminuido mundialmente debido a la mejora en los sistemas de salud. La prevalencia de VHC entre personas que adquirieron VIH a través del uso de drogas intravenosas alcanza el 90%. La coinfección con otros virus como VIH y VHB hace más difícil el tratamiento. La infección por el VHC también es frecuente en pacientes con hemodiálisis crónica (HD), con una prevalencia de entre 8 y 10 %[10]. Las vías sexual y perinatal, se consideran aun de bajo riesgo, ya que la situación de contagio continua siendo ambigua [11-13].

### **1.4 Diseños Experimentales para el Desarrollo de Vacunas**

La alta tasa de mutación del virus ha obstaculizado el desarrollo de una vacuna; sin embargo, una serie de enfoques se encuentran actualmente en desarrollo. Uno de los principales desafíos que enfrenta el desarrollo de una vacuna para el VHC es el alto grado de diversidad genética que se

manifiesta en el virus, estimado en 10 veces mayor que la observada en el VIH. Esto se debe a la que la RNA polimerasa viral no tiene la capacidad de corrección de error. La proteína de envoltura, que es el principal objetivo de los anticuerpos contra el VHC, es particularmente variable en los diferentes subtipos del VHC[14-15]. Otros factores que han obstaculizado el desarrollo de una vacuna para el VHC son la falta de un modelo animal accesible y el hecho de que el virus no se puede producir fácilmente en el laboratorio. No es posible desarrollar una vacuna que se dirige a todos los genotipos del VHC, pero las vacunas genotipo específico que se administran en las regiones donde predominan los genotipos específicos es un objetivo realista.

La primer vacuna candidato se administró a los seres humanos en 2003, y consistió en una proteína recombinante del VHC-E1 en adyuvante de alumbre (InnoVAC-C desarrollado por Innogenetics, Gante, Bélgica). La razón de ello es que se sabe que la presencia de anticuerpos preexistentes contra proteínas de la envoltura del VHC se ha asociado con una mejor respuesta al tratamiento con interferón. Después de varias inyecciones, la vacuna induce la producción de anticuerpos y la respuesta de células T[16-17]. No se han publicado nuevos estudios sobre esta vacuna y la empresa dejó el programa de la vacuna contra el VHC en 2008.

Una posible opción de vacuna terapéutica es IC41, fue desarrollada por Intercell AG (Viena, Austria), con base en cinco péptidos sintéticos que contienen 5 epítopes restringidos de VHC, HLA A2 CD8 + de células T, y 3 epítopes de CD4 +. Se ha demostrado que esta vacuna genera respuesta de células T proliferativa específica para VHC y además la respuesta específica

de IFN-gamma, tanto en individuos sanos como en infectados crónicamente por el VHC los estudios se encuentran en fase I [18].

Por último, una vacuna de células T con la proteína core del VHC producida en levaduras adsorbidas en una matriz compleja inmunoestimulante (ISCOM) está siendo desarrollado por Novartis, estudios en macacos muestran la inducción de la respuesta de los CD8 + y CD4 + de células T [19].

Estos son algunos de los ejemplos de los numerosos esfuerzos que se llevan a cabo con la finalidad de desarrollar una vacuna para contrarrestar al VHC.

## **1.5 Tratamientos Disponibles**

Las opciones terapéuticas son aun limitadas, los tratamientos disponibles son paliativos e inespecíficos para el VHC. el tratamiento estándar actual consiste en interferón- $\alpha$  pegilado combinado con ribavirina, el cual es frecuentemente difícil de tolerar y resulta en una respuesta viral sostenida (RVS) en aproximadamente 50% de los pacientes[20]. La RVS está relacionada con el genotipo viral, siendo así el genotipo 1 el de menor respuesta y el genotipo 2 el de una respuesta más favorable[21].

Los interferones (IFN's) son proteínas, específicamente glicoproteínas, conocidas como citocinas; fabricadas y liberadas por la célula huésped en respuesta a la presencia de patógenos, como son los virus. Permiten la

comunicación entre las células para desencadenar defensas del sistema inmune que erradica los patógenos. Actúan mediante la interacción con sus receptores epecíficos, los IFN's activan a transductores de señal y a complejos activadores de la transcripción o STAT. Esto desencadena la vía de señalización mejor conocida para los IFN's, la via Janus cinasa-STAT (JAK-STAT), provocando la activación de genes de respuesta al interferón [19]. Tienen un tiempo de vida media muy corto, es por ello, que se le realizó una modificación, añadiendo un polietilenglicol para dificultar su eliminación y aumentar el tiempo de vida media en el organismo.

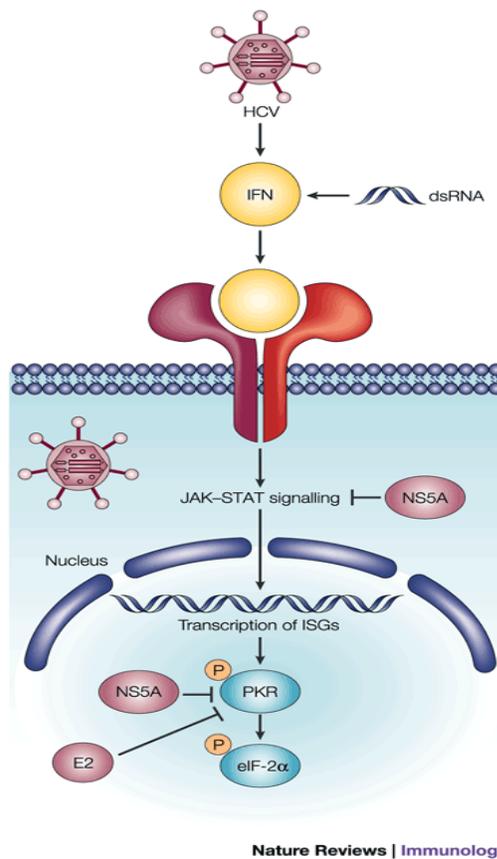


Figura 3. Mecanismo de acción del interferón [22].

La ribavirina es un nucleósido triazólico sintético, análogo de la guanosina e inosina. La acción que ejerce está directamente relacionada con su semejanza estructural con el nucleósido natural de guanosina. Los mecanismos de acción que se han descrito son: inmunomodulación de TH<sub>1</sub> sobre TH<sub>2</sub>, inhibición de IMPDH que lleva a la depleción de GTP, inhibición directa de la RNA polimerasa del VHC y mutagénesis que resulta en una menor infectividad (figura 4). Después de fosforilarse por enzimas celulares e ribavirinatrifosfato, su forma más activa biológicamente, puede actuar sobre enzimas del virus relacionadas con la síntesis de proteínas. Debido a esto, presenta un amplio espectro de actividad antiviral, tanto en virus DNA como RNA[23].

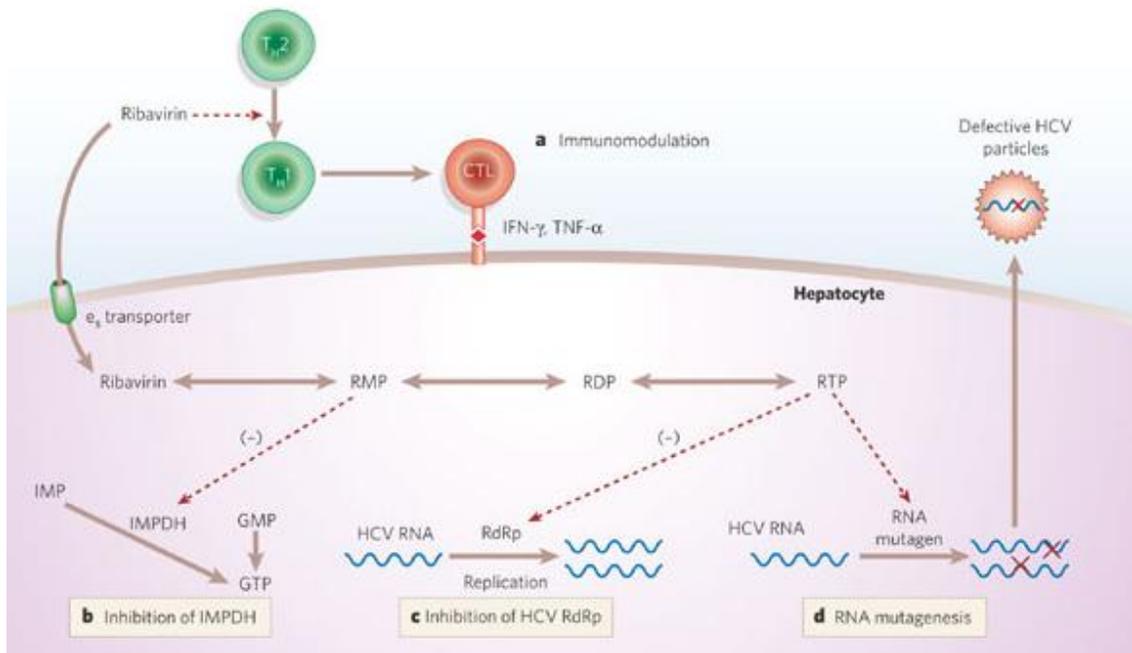


Figura 4. Mecanismos de acción de la ribavirina.

La politerapia consiste en administrar interferón  $\alpha$  pegilado (interferón A 3 millones de U, 3 veces por semana) más ribavirina (800-1200 mg/día). Los

estudios clínicos determinaron también la duración de la terapia: 48 semanas para el genotipo 1 y 24 semanas para el genotipo 2 y 3. Las tasas globales de respuesta viral sostenida son de 29 % para el genotipo 1 y 62 % para los genotipos 2 y 3.

Debido al bajo porcentaje de respuesta viral sostenida en los pacientes, a los efectos adversos presentes en la terapia y a la prevalencia se continúa con la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas.

La clase de fármacos que están siendo más estudiados, son los inhibidores de la serin proteasa de VHC, NS3-NS4A. La terapia STAT-C (*Specifically Targeted Antiviral Therapy*, por sus siglas en inglés), representa una colección de agentes bajo investigación para el uso en el tratamiento de la infección por el VHC. Estos incluyen inhibidores de la polimerasa (nucleósidos y análogos no nucleósidos) y los inhibidores de la proteasa que suprimen la replicación viral por inhibición selectiva de la síntesis de proteínas estructurales del virus. La evaluación de estos agentes ha producido una eficacia alentadora, mejorado la seguridad y la tolerancia de la terapia [24-26]. En mayo del 2011, la FDA aprobó dos de ellos, boceprevir y telaprevir, así que actualmente se encuentran disponibles como terapia combinada al tratamiento estándar (Tabla 1).

Por otro lado están los inhibidores de la polimerasa. Una respuesta antiviral rápida relacionada con la dosis, clínicamente significativa se observó con VCH-759 (un inhibidor no nucleósido) en monoterapia, que fue similar en ambos genotipos 1a y 1b [27]. VCH-222, otro inhibidor no nucleósido, también logró una rápida y potente supresión virológica cuando se

utiliza como monoterapia durante tres días [28]. El tratamiento en pacientes con infección por el genotipo 1 con el inhibidor no nucleósido de la polimerasa VHCPF-00868554 (filibuvir) dio lugar a un descenso rápido y moderado el RNA del VHC dentro de las 48 h del inicio del tratamiento, pero la mayoría de los sujetos experimentaron rebote o mesetas en sus niveles de RNA [29]. Entre muchos otros.

<b>Inhibidores de proteasa</b>	<b>Inhibidores de polimerasa</b>
Ciluprevir	Nucleósidos
ITMN-191/R-7227	Valopicitabine
Telaprevir*	R-1626/R-1479
Boceprevir*	R-7128/PSI-6130
GS-9132/ACH-806	MK-0608
BI-1335	No nucleósidos
TMC-435350	HCV-796
MK-7009	A-837093
	XTL-2125
	ANA-598
	GS-9190
	PF-00868554
	VHC-759
	BI-1941
	MK-3281

Tabla 1. Nuevas drogas dirigidas específicamente contra VHC. \*Fármacos aprobados por la FDA en 2011

## 1.6 Biología Molecular del Virus de la Hepatitis C

El virus de la hepatitis C fue identificado en 1989 por inmunodetección de suero de un paciente con hepatitis no A, no B [30]. Está clasificado dentro del género *Hepacivirus* en la familia *Flaviviridae*, existen 6 genotipos del virus y más de 50 subtipos. Estos genotipos difieren alrededor de 31 a 34 % en sus secuencias nucleotídicas, en tanto que los subtipos difieren cerca del 20 al 23 % [31]. Su genoma se compone de una cadena de RNA de polaridad positiva, la cual posee una región no codificante (NCR) en 5', que incluye un sitio de internalización del ribosoma (IRES), un marco de lectura abierta que codifica para una poliproteína de alrededor de 3 mil aminoácidos, y que está sometida a procesamiento co- y postraduccional por proteasas de la célula huésped y virales para producir proteínas virales individuales y una 3'NCR [32-33]. Las proteínas estructurales, las cuales forman la partícula viral, incluyen la proteína del core y las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2. Las proteínas no estructurales incluyen el canal iónico P7, la proteasa NS2-3, la serin proteasa NS3 y la RNA helicasa, el polipéptido NS4A, las proteínas NS4B y NS5A; y la NS5B, que corresponde a la polimerasa dependiente de RNA (RdRp)[34]. La región NCR 5', es altamente conservada y tiene una longitud de unos 340 nucleótidos y precede el codón de iniciación de la traducción. La NCR 3' de longitud variable consiste en una cadena corta no conservada de alrededor de 28-42 nucleótidos (Figura 3).

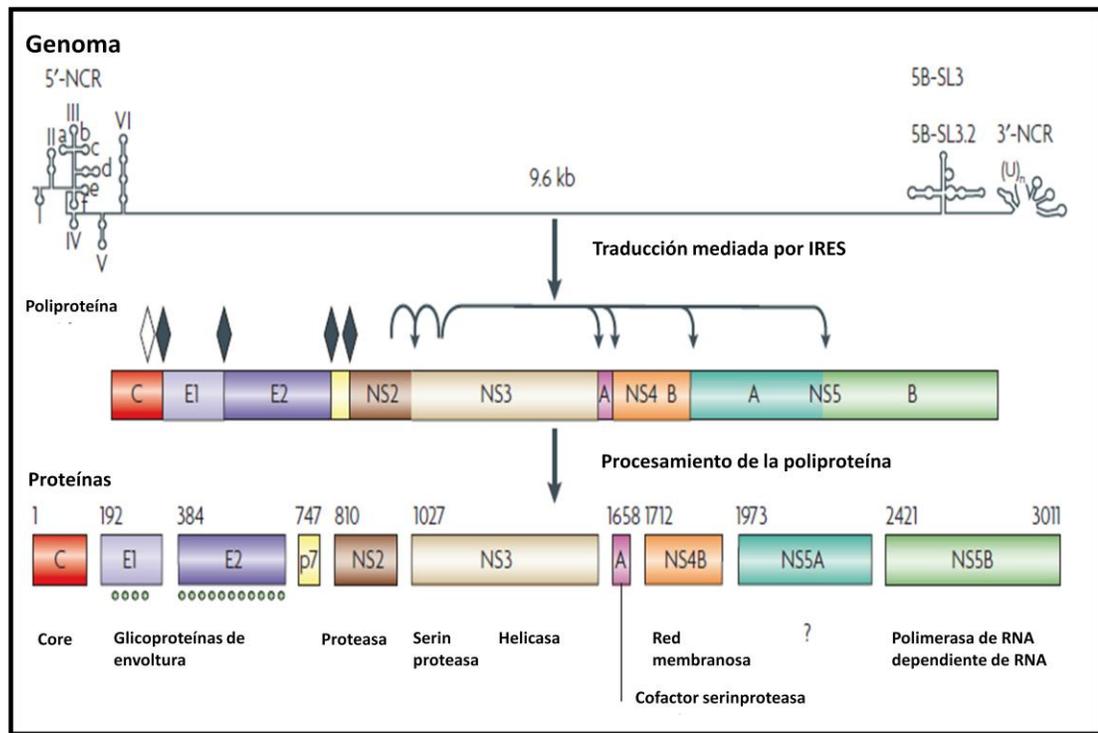


Figura 3. Organización genética y procesamiento de la poliproteína del VHC.

El VHC solo infecta a humanos y chimpancés, es un virus hepatotrópico, es decir, infecta preferentemente a hepatocitos; sin embargo, es capaz de infectar otros tipos celulares, tales como, células dendríticas, células B o células de kupffer. El virus circula en el huésped, unido a lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL), además también circula unido a inmunoglobulinas o como virión libre.[35] Se han propuesto varios receptores para VHC en la célula, algunos de ellos son, CD81, el receptor e LDL, scavenger receptor clase B tipo I, (SR-BI) y el más reciente Claudina-1.[36-38].

Una vez que es reconocido por los receptores de membrana, el virus se internaliza vía endocitosis mediada por clatrina, la acidificación del endosoma induce la fusión de la membrana glicoprotéica. Poco se sabe del proceso de pérdida de la envoltura, el cual resulta en la liberación del genoma en el citosol[20].

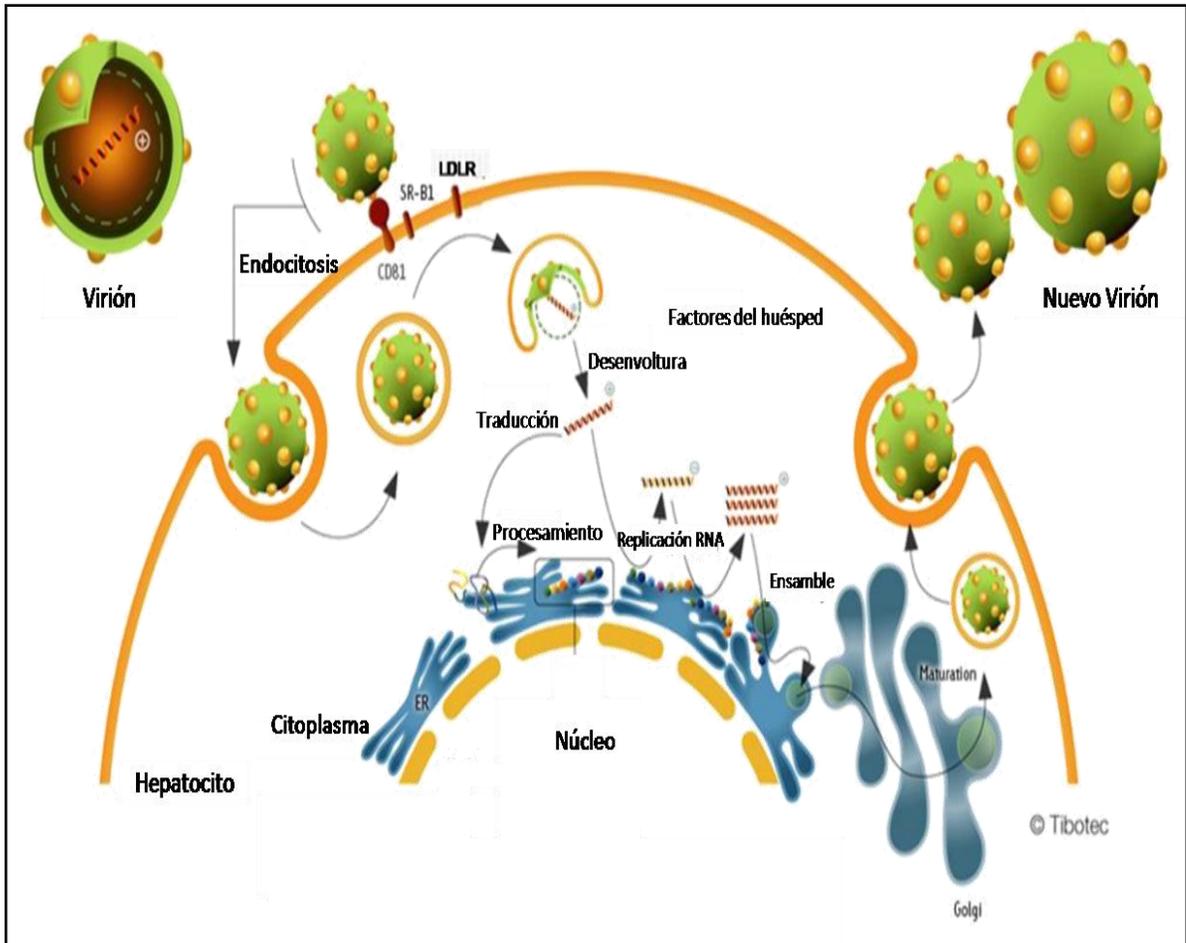


Figura 4. Ciclo viral de VHC.

## 1.7 Estrés Oxidativo y Replicación Viral

Las especies reactivas de oxígeno (ROS por *reactive oxygen species*) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular [39]. Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivos, ya que tienden a tomar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que provoca daños en la célula [40]. Cuando el aumento del contenido intracelular de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas, cáncer, etc. Además, es ahora

considerado como un jugador clave en el desarrollo y progresión de la patogénesis del hígado inducida por el VHC [41]. La infección por el virus produce un aumento en la generación ROS, lo que provoca estrés oxidativo en el hígado[42]. Las ROS pueden dañar el DNA directamente o mediante los compuestos con los cuales reaccionan como lípidos y proteínas, provocando mutaciones, las cuales son responsables del proceso de daño en el hígado y del desarrollo de cáncer hepático [43-44]. El incremento en las ROS puede potenciar la replicación del virus; esto es ciertamente ventajoso, ya que debe replicarse en los hepatocitos que se encuentran en G0 [34].

El virus puede inducir las ROS vía múltiples mecanismos: la localización particular de la proteína del core en la membrana externa de la mitocondria puede inducir un incremento en la oxidación del glutatión de la mitocondria y facilita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a ella por medio de la sensibilización momentánea de la permeabilidad de la membrana. También hay un incremento en la producción de ROS por el complejo I de la cadena de transporte de electrones y una redistribución del Citocromo C de mitocondria a citosol. Por otro lado las proteínas no estructurales incluyendo NS5A están asociadas con la membrana del retículo endoplásmico (RE), la cual activa la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE de esta manera induciendo estrés oxidativo [45]. Se ha demostrado que NS3 desencadena la producción de ROS vía activación de la oxidasa de NADPH (Nox2) [46] (Figura 5).

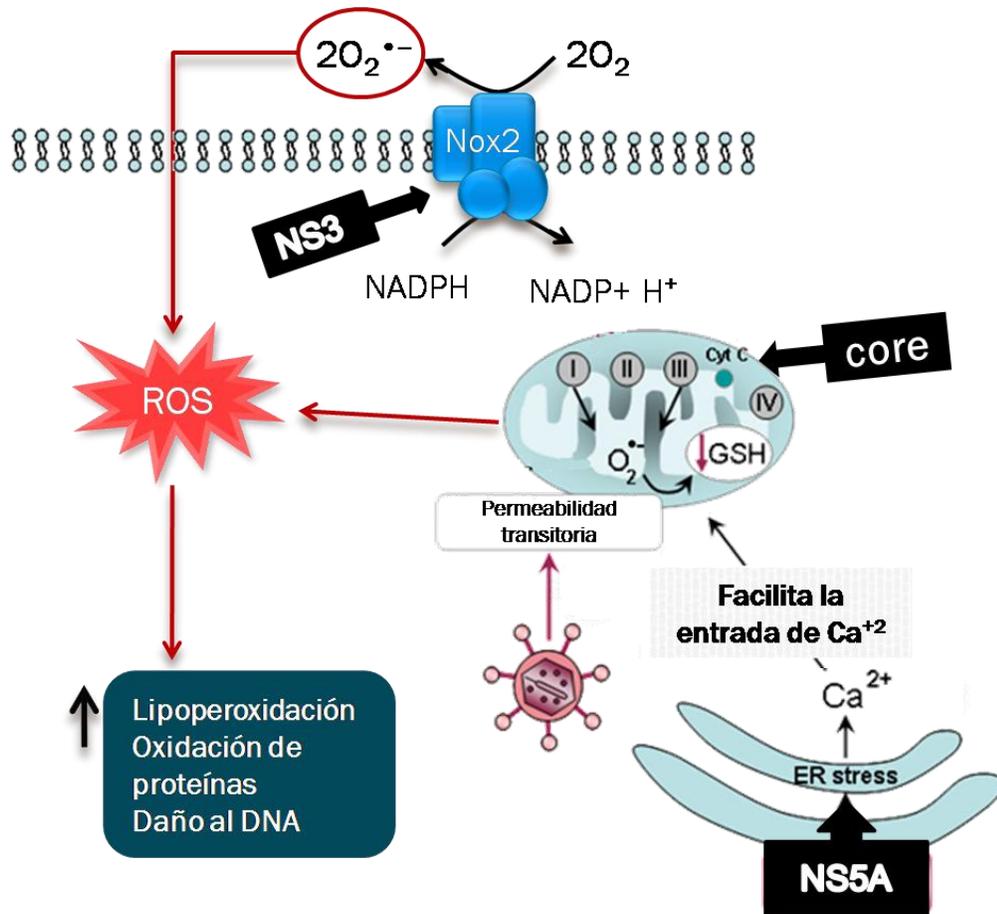


Figura 5. Mecanismos de inducción de ROS por el VHC

Bajo condiciones normales, numerosos sistemas antioxidantes existen para atenuar el estrés oxidativo y mantener el balance redox de la célula. Las ROS son eliminadas de la célula por enzimas antioxidantes incluyendo la glutatión peroxidasa (GSH), usando glutatión reducido como sustrato. Otros ejemplos son la superóxido dismutasa y la catalasa (Tabla 2) [46-47].

Antioxidantes enzimáticos	Ubicación celular	Propiedades antioxidantes
Mn superóxido dismutasa	Mitocondria	Dismuta radicales superóxido
Cu-Zn superóxido dismutasa	Citosol	Dismuta radicales superóxido
GSH peroxidasa	Citosol y mitocondria	Remueve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y hidroperóxidos orgánicos
Catalasa	Peroxisoma	Remueve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Antioxidantes no enzimáticos		
Vitamina E	Compuestos fenólicos solubles en lípidos; localizada en membranas.	Principal antioxidante que disrumpe la cadena de peroxidación lipídica.
Vitamina C (ácido ascórbico)	Soluble en agua; localizada en citosol.	Neutraliza una amplia variedad de ROS en fase acuosa; regenera vitamina E
Glutati6n (GSH)	Citosol y mitocondria.	
Ácido lipoico	Tiol end6geno; localizado tanto en la fase acuosa como en la lipídica.	Interviene en el reciclado de vitamina C; puede ser buen sustituto de GSH
Ubiquinonas	Derivados de quinona soluble en lípidos; localizadas en membranas.	Las formas reducidas son antioxidantes eficientes
Carotenoides	Soluble en lípidos; localizados principalmente en membranas.	Antioxidantes; reducen la peroxidaci6n lipídica.

Tabla 2. Principales antioxidantes, su ubicaci6n y su funci6n.

Un v6nculo entre el estr6s oxidativo y la patog6nesis es tambi6n apoyado por estudios cl6nicos sugiriendo que la terapia antioxidante podr6a mejorar el da6o hep6tico y ser 6til en el manejo de pacientes con VHC[42].

### 1.5 Modelo de Replicaci6n Subgen6mico VHC

Uno de los inconvenientes para el estudio de las infecciones producidas por el VHC es la falta de un sistema *in vitro* o *in vivo* capaz de mantener la replicaci6n del virus. Aunque, se ha descrito la detecci6n de la replicaci6n del VHC en varios sistemas celulares, tanto de origen humano como no humano,

en ningún caso dicha replicación ha sido suficiente como para poder llevar a cabo estudios concluyentes [48]. Como consecuencia de ello, son limitados los conocimientos sobre los mecanismos moleculares responsables de la persistencia de la infección viral. Además, esto ha dificultado enormemente el desarrollo de nuevas alternativas para la profilaxis y el tratamiento de la hepatitis C. En 1999, Barstenschlager y cols, lograron establecer el primer replicón subgenómico del VHC en la línea celular de hepatocarcinoma humano (Huh-7) [49]. Este replicón lo obtuvieron a partir de una clona que contenía el genoma del VHC aislado de pacientes infectados.

El desarrollo de replicones subgenómicos de RNA del VHC capaces de mantener niveles de expresión estables, representan la principal alternativa para el estudio de los mecanismos de infección del virus. El replicón subgenómico del VHC es RNA bi-cistrónico, y contiene un gen de resistencia a neomicina bajo el control traduccional de la región IRES de VHC seguida de las proteínas no estructurales del virus desde NS3 hasta NS5B bajo el control traduccional de la región IRES de EMCV, se muestra un esquema del replicón en la figura 5.



Figura 5. Replicón subgenómico de VHC

Los replicones subgenómicos del VHC aún careciendo de la región que codifica para las proteínas estructurales del VHC, contienen todos los elementos necesarios para estudiar su replicación y traducción. Son capaces de producir nuevas moléculas subgenómicas que a su vez, pueden continuar replicándose, pero no son capaces de originar virus completos infecciosos, por lo tanto es un sistema seguro para trabajar. Se ha demostrado también, que estos replicones subgenómicos son capaces de producir estrés oxidativo en la célula, por lo tanto, pueden ser utilizados para evaluar la modulación del estrés oxidativo[50]. Por lo anterior, este sistema representa una alternativa para avanzar tanto en el estudio de los mecanismos de replicación del VHC, como en el desarrollo de nuevas expectativas para la profilaxis y tratamiento de la hepatitis C, en el que los blancos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos son la proteínas; NS2-NS3 y NS3 proteasa, NS3 helicasa y NS5B.

## 1.9 Factor de crecimiento de hepatocitos

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor disperso (*scatter*), se identificó en 1984 como una glicoproteína con gran actividad mitogénica en cultivos primarios de hepatocitos. Posteriormente se encontró que presenta actividades biológicas adicionales como: mitogénesis, angiogénesis, morfogénesis, aumento de la motilidad celular y antiapoptosis en una gran variedad de células principalmente células epiteliales y endoteliales, así como diferentes tejidos durante el desarrollo embrionario y en el curso de varias patologías[51-54]. Estudios *in vitro* muestran que el HGF estimula el crecimiento de hepatocitos en cultivo primario[55-57]. Diversos estudios indican también, que el HGF promueve la regeneración del hígado *in vivo*. La administración de HGF exógeno incrementa el índice de regeneración del hígado. Por otro lado, estudios en ratones transgénicos de HGF demuestran que, después de realizarles una hepatectomía parcial, le toma la mitad del tiempo para regenerarse al tamaño normal en comparación con los controles[58-59].

El receptor específico para HGF ha sido identificado como producto del protooncogén c-Met[60-61]. Por medio de estudios de receptores quiméricos, se ha sugerido que todas las actividades biológicas del HGF son transducidas a través de la proteína de superficie c-Met.

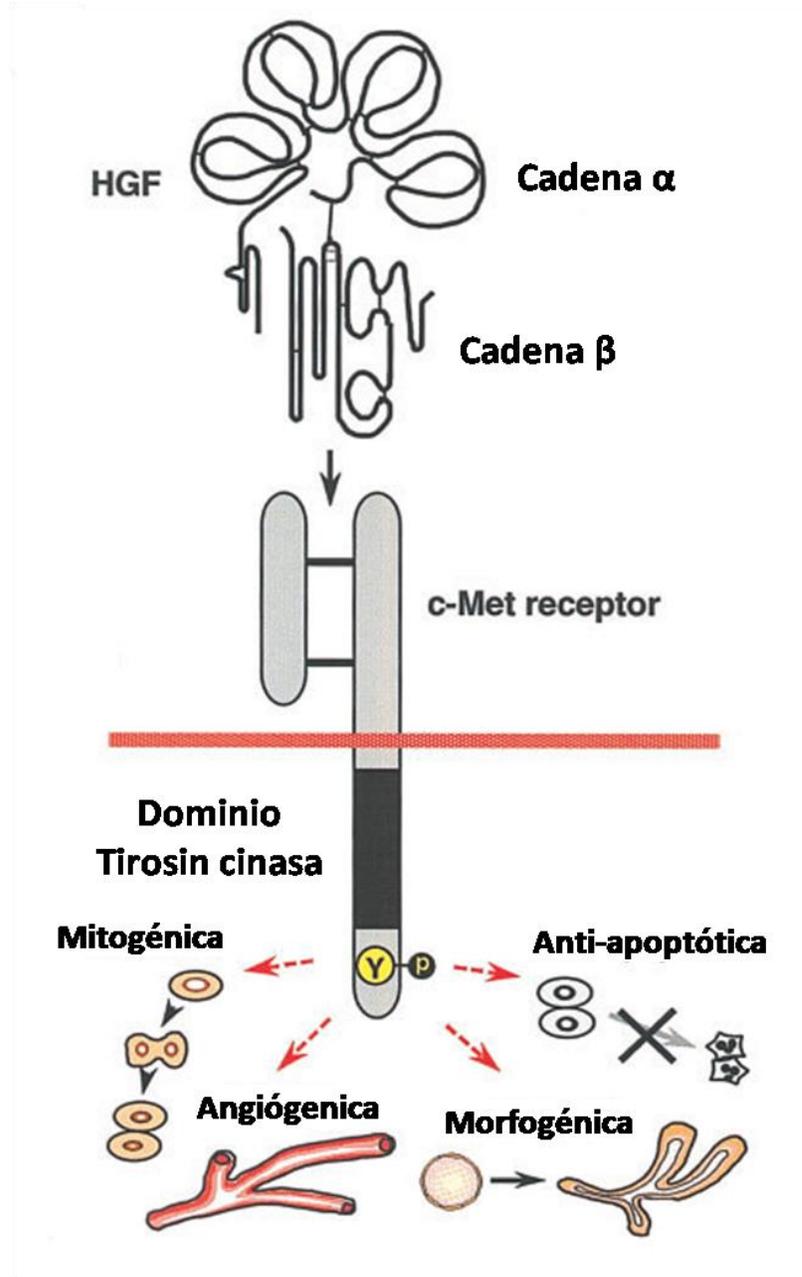


Figura 6. Estructura esquemática del receptor de HGF, c-Met y la actividad biológica de HGF[62].

Su capacidad para estimular la mitogénesis, la motilidad celular, y la invasión de la matriz le confiere papel central en la angiogénesis,

tumorigénesis, y la regeneración de tejidos. Es secretado como un polipéptido inactivo y es escindido por serin proteasas, en una cadena alfa de 69-kDa y una cadena beta de 34 kDa. Un puente disulfuro entre las cadenas alfa y beta produce la molécula heterodimérica activa. La proteína pertenece a la subfamilia del plasminógeno de las peptidasas S1 pero no tiene ninguna actividad detectable de proteasa. El splicing alternativo de este gen produce múltiples variantes de transcripción que codificaban las distintas isoformas[63].

Los mecanismos de transducción de señal post-receptor son todavía poco comprendidos (Figura 7). En hepatocitos, el HGF ha demostrado inducir la expresión de algunos genes tempranos incluyendo c-jun[59]; y activar algunos mensajeros secundarios como las protein-cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [64-65]; sin embargo, todavía se desconocen todos los efectores que participan en esta vía de señalización.

La activación de Met induce la actividad cinasa catalítica, lo que desencadena la fosforilación de las tirosinas Tyr 1234 y Tyr 1235. Estas dos tirosinas activan transductores de señales, iniciando así un amplio espectro de actividades biológicas impulsadas por Met, usualmente conocido como el programa de crecimiento invasivo [66].

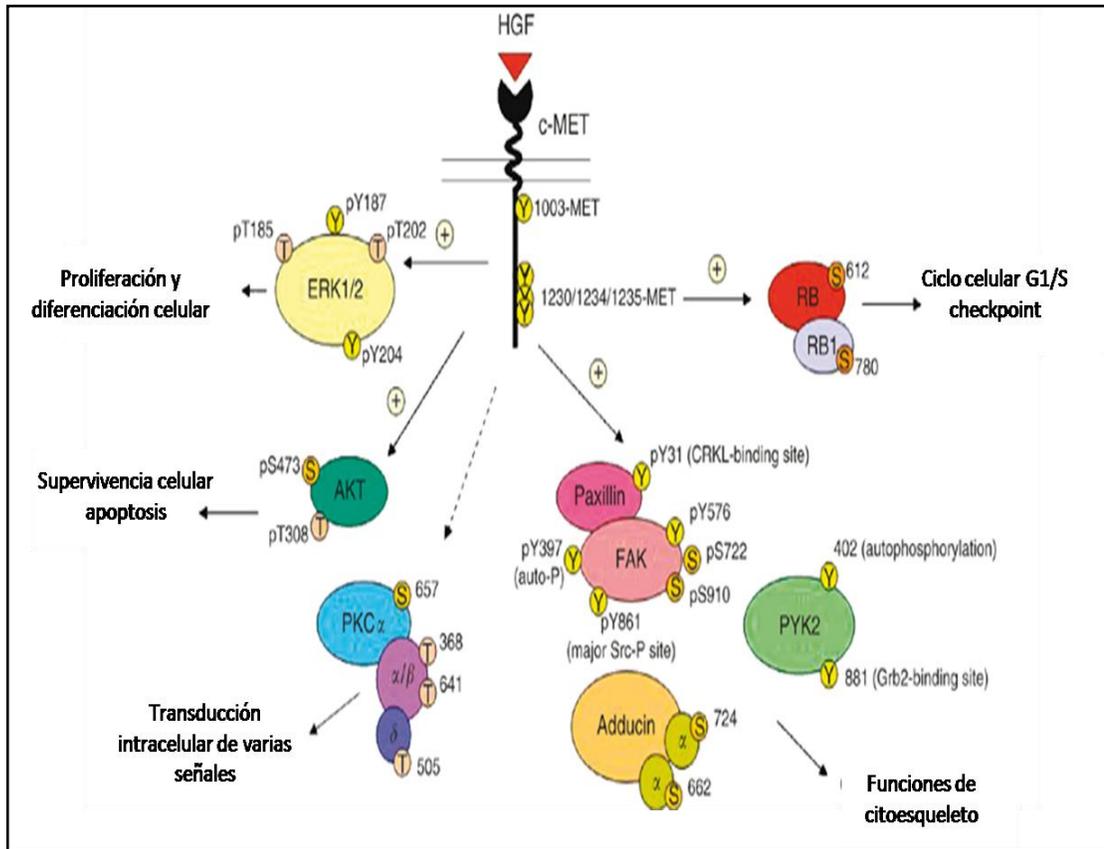


Figura 7. Vías de transducción de señales desencadenadas por HGF/c-Met[67].

La administración de HGF es valiosa en diversos modelos de enfermedades hepáticas, falla renal, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, el uso en humanos está restringido debido al posible papel del HGF en la propagación de algunos tumores.[68]

Los datos acumulados sugieren que HGF puede funcionar como un factor antioxidante capaz de proteger contra el estrés oxidativo celular a través de la modulación de los niveles intracelulares de GSH, el principal determinante del potencial redox celular, enzimas y citoprotectores [69]. La señalización PI3K/Akt conduce a la activación del factor de transcripción

nuclear  $\kappa$ -B (NF $\kappa$ -B), que a su vez regula la expresión de genes antioxidantes [70]. Es por ello que se enfoca este trabajo en evaluar el posible efecto antioxidante que el HGF tenga sobre el modelo celular utilizado y la expresión del VHC.

## II. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

Recientemente se han probado distintas alternativas terapéuticas que pueden funcionar como adyuvantes. Ejemplo de ello es el efecto que posee el ácido acetilsalicílico (AAS), sobre la replicación y expresión del VHC. El AAS fue capaz de disminuir los niveles de RNA viral y proteína viral, y el efecto fue dependiente del tiempo. Este efecto, parece ser modulado por un intermediario de la vía del estrés oxidativo [48]. Otra alternativa poco estudiada, es el factor de crecimiento de hepatocitos, del cual se han reportado propiedades antioxidantes, por mencionar algunas, provoca la disminución de las especies reactivas de oxígeno responsables del estrés oxidativo en hepatocarcinoma celular [71], se ha descubierto también un efecto benigno en pacientes infectados con HCV que se encuentran en tratamiento frecuente con diálisis y lo han asociado a la presencia de este factor [30].

Existen algunos sistemas antioxidantes celulares que previenen o modulan el daño oxidativo. Estos sistemas son clasificados como enzimáticos (SOD, catalasa y glutatión peroxidasa), antioxidantes preventivos (transferrina y ceruloplasmina) y antioxidantes secuestradores de ROS ( $\alpha$ -tocoferoles,  $\beta$ -carotenos, Vitamina C, ácido úrico y bilirrubina). Algunas moléculas como la vitamina E y el glutatión participan en la regulación de ROS, y estas moléculas son estimuladas por factores de crecimiento como el HGF a través de su receptor Met. Se ha estudiado ampliamente el sistema HGF/Met en procesos de carcinogénesis y de protección antiapoptótica. En el 2008, Gómez Quiroz y

colaboradores, relacionaron la ausencia del receptor Met, al aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, estos datos proveen evidencia de que la señalización por Met es un factor crítico en la protección contra generación excesiva de especies reactivas de oxígeno [72]. En este estudio realizaron la evaluación del estrés oxidativo utilizando ratones knock-out para el receptor Met (Met-KO), encontrando que en la ausencia de dicho receptor se detectaba un aumento en la generación de ROS (panel b, figura 8) a comparación del control que si expresaba Met (Cre-Ctrl. Panel a, figura 8).

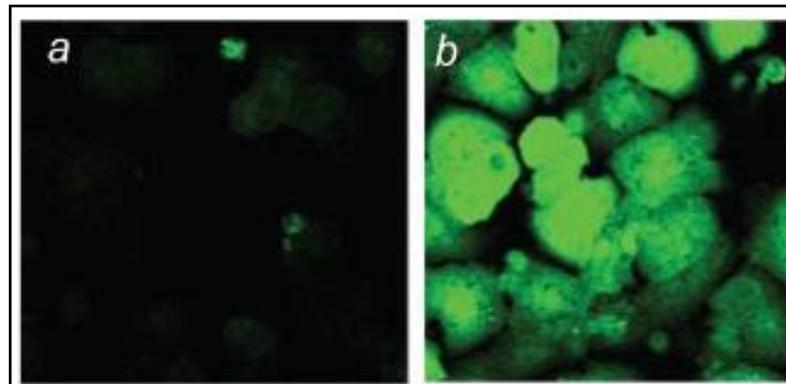


Figura 8. Los hepatocitos Met-KO están sujetos a estrés oxidativo.

Además, se encontró que existe una diferencia en el nivel proteico de enzimas antioxidantes, como la Catalasa y la CuZn SOD, presentándose una mayor cantidad de éstas desde el tiempo cero de los hepatocitos Met-KO, a diferencia del control (Figura 9).

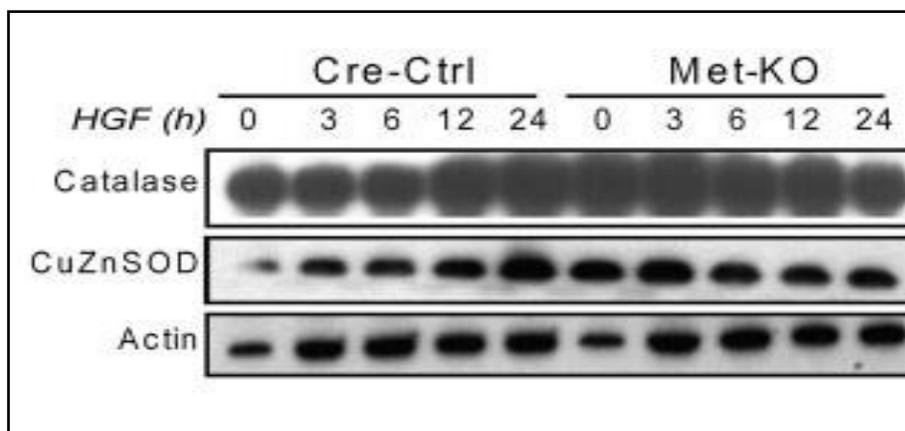


Figura 9. Expresión de proteínas antioxidantes. Extractos de lisados completos se prepararon de los hepatocitos Cre-Ctrl y Met-KO tratados con HGF (40 ng/ml) a tiempos 0, 3, 6, 12 Y 24 h.

En este mismo estudio se demostró que la relación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), se ve disminuida en ausencia del receptor del HGF, además, de que en los hepatocitos normales que si expresan el receptor y que fueron tratados con HGF, la relación aumentó significativamente.

Por otro lado Lee y colaboradores en el 2009, probaron el efecto del HGF en las líneas celulares de hepatocarcinoma humano HepG2 y Hep3B (VHB +), lo cual resultó en una supresión de la producción de ROS [71] (Figura 10).

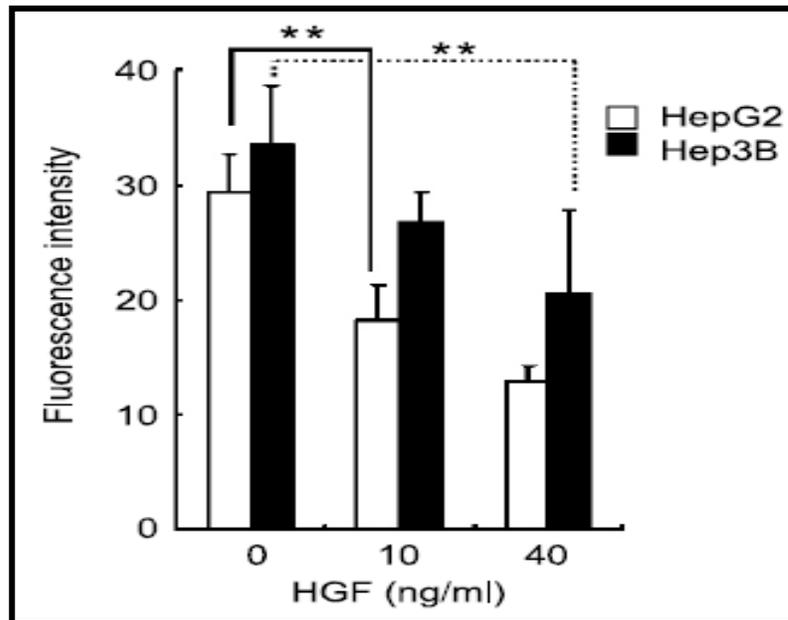


Figura 10. Efecto del HGF en la acumulación de ROS.

Poco se sabe en cuanto a la relación que posee el HGF con la enfermedad del hígado causada por el VHC, Rampino y colaboradores, en 1999, demostraron que la enfermedad hepática provocada por el VHC se ve beneficiada en pacientes en tratamiento frecuente de diálisis y puede depender de la marcada y prolongada liberación de HGF debida a la diálisis (Figura 11) [30].

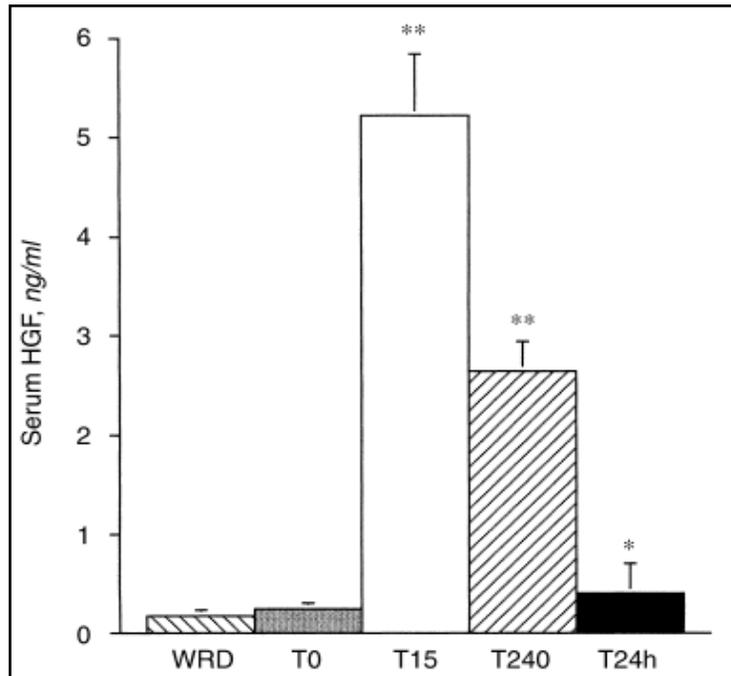


Figura 11. Niveles de HGF en suero de pacientes sin patología renal (WRD) y de pacientes sometidos a tratamiento con diálisis regulares (RDT).

En 2002 Borawski y colaboradores, demostraron que existe una relación entre los niveles de HGF sérico y proteínas relacionadas con el estrés oxidativo como la Cu/Zinc Superóxido dismutasa (Cu/Zinc SOD), en pacientes VHC positivos sometidos a tratamiento con diálisis frecuentes [73].

Por otro lado en 2010, Barril y colaboradores, evaluaron lo que hicieron Rampino y cols. en 1999 pero utilizaron membranas de alto y bajo flujo y sometieron a los pacientes a diálisis intermitentes o diarias, con la finalidad de descartar si el tipo de membrana utilizada o el esquema de diálisis utilizado afectaba en el aumento a nivel sérico de HGF y en la disminución en los niveles de RNA del virus, en pacientes VHC positivos en tratamiento con diálisis, no observaron diferencias entre las distintas variables con lo que

comprobaron que el efecto es independiente del tipo de membrana utilizada y del esquema de diálisis. [74].

Es por ello que la presente tesis se enfoca en la evaluación del efecto del HGF en células que expresan las proteínas no estructurales del VHC con el fin de obtener un acercamiento al mecanismo por el cual logra la disminución de la carga viral sistémica en los pacientes dializados y esclarecer si existe una relación con proteínas e intermediarios del estrés oxidativo.

### III. JUSTIFICACIÓN

Es de gran importancia la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para el VHC, ya que a la fecha el tratamiento administrado a pacientes infectados, interferón  $\alpha$ -pegilado /ribavirina, posee una baja respuesta viral sostenida, es por ello que se deben buscar tratamientos que funcionen como adyuvantes en la terapia. Se ha reportado que en pacientes sometidos a diálisis existe un aumento en los niveles séricos de HGF y al mismo tiempo que disminuyen los niveles de RNA de VHC [30, 74], sin embargo, no se sabe si existe una relación entre estos dos factores o bien si son eventos independientes. Con base en lo anterior nuestro grupo de investigación propone que puede existir una relación entre el factor de crecimiento y los niveles de estrés oxidativo en la célula provocado por la infección del VHC, y que en conjunto podrían definir los niveles de expresión del virus. A la fecha, no se han realizado estudios in vitro con el fin de evaluar este efecto, es por ello que el presente trabajo tiene la finalidad de evaluarlo en células que expresan constitutivamente las proteínas no estructurales del VHC, y la relación que esto tenga en la modulación del balance redox.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto del factor de crecimiento de hepatocitos en la expresión del virus de la Hepatitis C y su relación con el estrés oxidativo utilizando el sistema celular Huh-7 que expresa constitutivamente proteínas no estructurales del VHC.

### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Evaluar el efecto del HGF en la replicación y expresión génica del VHC en el modelo de replicón subgenómico en células HuH-7.
2. Evaluar la modulación de los niveles de estrés oxidativo en células Huh-7 parental y replicón, en presencia y ausencia del HGF.
3. Evaluar la participación de las proteínas antioxidantes SOD-1, SOD-2 y catalasa en células Huh-7 parental y replicón, en presencia y ausencia del HGF.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos

Para el mantenimiento de la línea celular se utilizó medio de cultivo Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (ADMEM. GIBCO, Invitrogen, EUA) suplementado con L-glutamina (200 mM, 100X), suero bovino fetal (SBF, 2X), antibiótico penicilina-estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G sódica y 100 ug/mL de sulfato de estreptomicina) y aminoácidos no esenciales (10 mM, 100X). Para realizar los subcultivos se utilizó Tripsina-EDTA 1X (GIBCO, Invitrogen, EUA). En el caso de las células replicón se utilizó geneticina G418 (Geneticina; Gibco-BRL). Se empleó material de plástico como, puntas plásticas desechables, tubos eppendorf de 0.2, 0.6 y 1 mL, tubos falcon de 15 y 50 mL (Corning, EUA) botellas de cultivo de 25 y 75 cm<sup>2</sup> (Corning, EUA), placas de cultivo de 24 y 96 pocillos, placas de cultivo de 100 x 20 mm (Corning, EUA), raspadores plásticos estériles (Corning, EUA) y pipetas serológicas de 5 y 10 mL (Corning, EUA). Para el recuento celular se utilizó el colorante azul de tripano al 0.4 % (Gibco, Invitrogen, EUA).

Para el ensayo de viabilidad celular se utilizó el reactivo azul alamar al 10 % (Invitrogen, EUA).

Para la extracción de RNA se utilizó, Trizol (Life Technologies), cloroformo e isopropanol (Sigma)

Se utilizó el kit High-Capacity cDNA Archive de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) para la síntesis de cDNA. Para la PCR en tiempo real se utilizó el reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Para normalizar los resultados de expresión se utilizó el ensayo de  $\beta$ -Actina 20X también de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

En la extracción de proteínas totales se empleó inhibidor de proteasas (Roche, Alemania). La curva estándar de calibración se hizo con albúmina sérica bovina ph 5.2 grado reactivo (Amresco, EUA).

Para los geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida (Invitrogen, EUA) y N-N'-metilbisacrilamida (Invitrogen, EUA) proporción 29:1, SDS 10X (ICN Biomedicals, EUA), Tris-HCl pH 8.8 y pH 6.8, los catalizadores TEMED (Bio-Rad, EUA) y persulfato de amonio (Sigma, EUA) grado reactivo. El buffer de corrida se preparó con Tris-base (Sigma, EUA) glicina (Sigma, EUA) y SDS (ICN Biomedicals, EUA). Se utilizó un marcador de peso molecular de 10-225 kDa (Promega, EUA).

Para el western blot se utilizó el buffer de transferencia que fue preparado con Tris Base, Glicina, SDS y agua destilada

## 5.2 Equipos

El cultivo celular se realizó en una campana de flujo laminar clase II, tipo A2 (Nuaire) y en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, y 37°C de temperatura (Nuaire). Se empleó un microscopio invertido (Olympus CKX41) para la observación de las células en cultivo.

Para la lisis celular mecánica se utilizó un vórtex (Vortex-gene 2 Scientific Industries), la centrifugación se hizo en una centrifuga refrigerada Heraeus (Osteroide, Alemania) y en minicentrífuga (Centrifuge Eppendorf 5415D). La viabilidad celular y los extractos proteicos se cuantificaron en un lector de Elisa (ELX 800, Biotek).

Para las lecturas de fluorescencia se utilizó un lector de placas Synergy HT BioTek.

## 5.3 Líneas Celulares

Se utilizó la línea celular de hepatocarcinoma humano Huh-7 replicón que expresa establemente las proteínas no estructurales del VHC y la línea celular parental Huh-7 (sin replicón), donadas amablemente por el Dr. A Koromilas (Lady Davies Institute, McGill University, Canadá). Ambas líneas celulares fueron crecidas en medio de cultivo ADMEM suplementado con 2% de suero bovino fetal (SBF), 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, 1% de aminoácidos no esenciales y en una atmósfera húmeda

de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Además, las células Huh-7 replicón fueron mantenidas en presencia de 500 µg/ml del fármaco G418 que se utiliza como marcador de selección. La geneticina fue removida antes de realizar los experimentos.

#### **5.4 Conteo Celular con Azul de Tripano y Siembra en Placa**

Una vez alcanzada la confluencia de 90-95 %, se les adicionó tripsina (0.25 %) a las células para despegarlas de la superficie de la botella, por un tiempo de 5-10 min, a 37 °C, a continuación se inactivo la tripsina con el mismo volumen de medio de cultivo suplementado. Se recuperó la suspensión celular en un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó por 5 min a 1000 rpm para obtener un botón de células, el cual se resuspendió en el volumen de medio apropiado descartando el sobrenadante de la centrifugación. De la suspensión celular se preparó una dilución (1:8) con medio de cultivo y azul de tripano, para contar las células en la cámara de Neubauer. Se sembraron las células según el experimento a realizar.

## 5.5 Tratamiento con HGF

A partir de un vial con 10 ug de HGF liofilizado (Peprotech), se preparó el stock de trabajo, se adicionó 1 mL de agua Mili-Q estéril, teniendo una concentración final de 10 ug/mL.

Con la finalidad de determinar la concentración de HGF con la cual se trabajaría, se realizó un ensayo de viabilidad celular por el método del azul alamar. Se sembraron  $1.5 \times 10^3$  células Huh-7 replicón en placas de 96 pozos, se probaron 3 concentraciones distintas 20, 50 y 100 ng/mL y a los tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas, se evaluó por colorimetría el viraje de azul a rosa mediante la medición de la absorbancia a 600 nm y 570 nm, esta última usada como referencia.

Una vez definida la concentración en 50 ng/mL de HGF, las células Huh-7 replicón y Huh-7 parental fueron sembradas e incubadas por al menos 12 horas para su estabilización y adhesión a la superficie de la placa. Posteriormente, se les realizó un cambio de medio, sustituyéndolo con medio sin SBF, con la finalidad de eliminar el efecto que pudiesen tener los factores de crecimiento presentes en el medio suplementado, se incubaron por 6 horas, y posteriormente se les adicionó 50 ng/mL de HGF y se incubaron durante 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h, según el parámetro a evaluar. Cada condición se realizó por triplicado y con su respectivo control sin tratamiento (Figura 12).

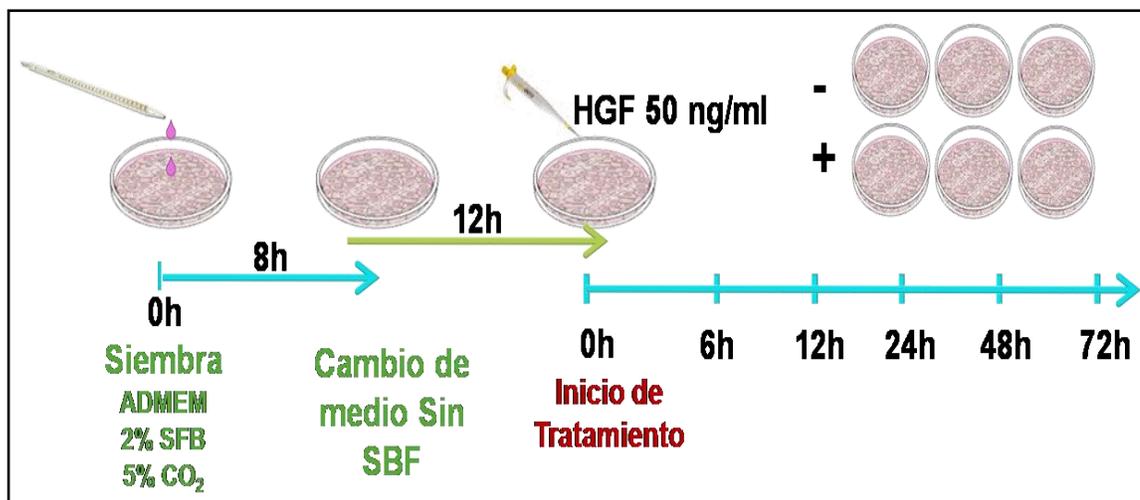


Figura 12. Esquema general de tratamiento con HGF.

## 5.6 Expresión de RNA y Proteínas Virales de VHC

### 5.6.1 Extracción de RNA Total

Para este ensayo se sembraron  $2 \times 10^5$  células en placas de 6 pozos a las cuales se les proporcionó el tratamiento descrito previamente. El RNA total se extrajo a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas utilizando el reactivo Trizol de acuerdo con las especificaciones del proveedor (31). El RNA fue precipitado, lavado y resuspendido en 12 $\mu$ L de agua DEPC libre de RNAsas y almacenado a -70°C hasta el momento de su uso.

### **5.6.2 Cuantificación Relativa del RNA de VHC**

A partir de 5 uL de RNA se sintetizó el cDNA por RT-PCR utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), en un volumen final de 20 uL. El cDNA obtenido fue cuantificado utilizando un Nanodrop.

Una vez obtenido el cDNA se realizó una escalera de distintas cantidades de cDNA para establecer la cantidad con la cual se realizarían los ensayos de PCR en tiempo real o cuantitativa. Para la PCR cuantitativa se utilizó un ensayo que contiene la sonda TaqMan y los iniciadores diseñados sobre regiones para NS5A. Así mismo, se utilizó el reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Los volúmenes de reacción fueron los siguientes: 10 uL del PCR Master Mix, 1 ul del ensayo conteniendo la sonda Taqman y los iniciadores de NS5A, 2.5 ul de cDNA conteniendo 50 ug y se completó a 20 uL con agua. Para normalizar los resultados de expresión se utilizó el ensayo de  $\beta$ -Actina 20X también de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Cada condición se realizó por triplicado. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR System de Applied Biosystems.

### **5.6.3 Extracción de Proteínas y Cuantificación por Bradford**

Para este ensayo se sembraron  $1 \times 10^6$  células en placas de 100 x 20 mm, se les expuso al tratamiento mencionado previamente y se extrajo la

proteína total a las 0, 24, 48 y 72 horas post-tratamiento, utilizando un buffer de lisis conteniendo 10mM de Tris-HCl pH 7.5, 50mM de KCl, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1% de Tritón-X-100, 1mM de DDT, 1mM de PSMF y un stock de inhibidores de proteasas. Después, el lisado celular se incubó por 20 min en hielo, se centrifugó, y se colectó el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total por el método de Bradford y fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. El método de Bradford se realizó en microplaca, se utilizó 1 uL del extracto proteico, diluido en proporción 1:5 con agua mili-Q y 40 uL de reactivo de Bradford (Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad, EUA), mezclando y dejando reposar por 5 min. a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de color de la reacción. La absorbancia se leyó a 600 nm de longitud de onda usando un lector de placas de Elisa (ELX800, Biotek). La cantidad de proteína fue estimada interpolando el valor de absorbancia de cada muestra en la curva estándar de referencia construida previamente con albúmina sérica bovina en un rango de 1 a 20 ug/mL. Los extractos cuantificados se conservaron a -80°C hasta su uso.

#### **5.6.4 Western Blot de la Proteína Viral NS5A**

Para el ensayo de western blot se utilizaron 40 µg de proteína total. Previo a su resolución en el gel de poliacrilamida, fueron desnaturalizadas con el buffer de carga a 95°C por 5 min. Posteriormente fueron resueltas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), que consistió

en un gel separador al 10 % y un gel concentrador al 5%, esto en un periodo de aproximadamente 2 horas a 80 volts. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF, por 2 horas aproximadamente a 120 volts, en frío y en agitación. Una vez terminada la transferencia la membrana fue teñida con el reactivo Rojo de Ponceau, con la finalidad de evaluar la integridad de las proteínas transferidas. Posteriormente la membrana se sometió a lavados para eliminar el colorante, se bloqueó con leche al 2% por una hora y se realizaron lavados para eliminar el exceso de leche. La membrana fue incubada con los anticuerpos primarios anti-VHC NS5A, y anti- $\beta$  actina, a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno con buffer TBS 1X al 0.1%Tween. A continuación se adicionó el anticuerpo secundario correspondiente a cada anticuerpo primario y se dejó incubando y en agitación por 2 horas. Para finalizar se realizaron 3 lavados con buffer TBS-Tween 1x y se procedió con el revelado. La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo fue visualizada empleando un kit de Quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnologies y se tomó la imagen por un fotodocumentador de quimioluminiscencia de Bio Rad utilizando el software Quantity One.

## **5.7 Medición de Marcadores de Estrés Oxidativo**

### **5.7.1 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno.**

La producción de especies reactivas de oxígeno se comprobó por la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína (DCFH) en presencia de peróxidos. Para este ensayo se sembraron  $1.5 \times 10^3$  células en cajas de 96 pozos, especiales para fluorescencia, y se sometieron al tratamiento antes mencionado. Posteriormente se agregó  $1 \mu\text{M}$  de DCFH-DA [ $5 \text{ mM}$ ] y se incubó durante 30 min en oscuridad. Inmediatamente se determinó la fluorescencia de la DCFH usando un lector multimodal de microplacas Synergy HT BioTek; a 529 nm/503 nm (emisión/exitación). Para este ensayo se le proporcionó a las células un pre-tratamiento con HGF de 12 horas y posterior a eso se le agregó al cultivo  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2 \text{ mM}$  como control positivo de daño, llevándose a la par el control sin tratamiento y el control de HGF solamente.

### **5.7.2 Determinación de Proteínas Oxidadas**

Para este ensayo se sembraron  $1 \times 10^6$  células en placas de  $100 \times 20$  mm, para extraer proteína a las 0, 24, 48 y 72 horas, se realizó la extracción de proteína total como se describió previamente

La producción de grupos carbonilos en las proteínas oxidadas se determinó por Western blot usando el estuche comercial Oxyblot (Chemicon), el cual consistió en la derivatización de  $20 \mu\text{g}$  de proteína total, utilizando el

reactivo DNPH (dinitrofenilhidrazona). En una primera etapa se añadió a cada tubo una cantidad 1:1 de SDS al 12%, después se añadieron 10 uL de DNPH, y se dejó reaccionar al menos 15 minutos y sin sobrepasar los 30 min. posteriormente se adicionaron 7 uL del reactivo neutralizante de la reacción y se procedió a cargar el gel de poliacrilamida a las mismas condiciones que fueron descritas para el Western blot. Se realizó la transferencia siguiendo las mismas especificaciones que para el Western blot. Se bloqueó la membrana y posteriormente se incubó con los anticuerpos provistos por el kit, los cuales están dirigidos contra el grupo que fue derivatizado en la proteína y que indicará la presencia de proteínas oxidadas, se incubó con el anticuerpo secundario, y se realizaron los lavados correspondientes. La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo fue visualizada empleando un kit de Quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnologies y se tomó la imagen por un fotodocumentador de quimioluminiscencia de Bio Rad utilizando el software Quantity One.

### **5.7.3 Determinación del Nivel Proteico de SOD-1, SOD-2 y Catalasa**

Con la finalidad de evaluar el nivel de las enzimas antioxidantes SOD-1, SOD-2 y Catalasa, se utilizaron 40 µg de proteína total. Previo a su resolución en el gel de poliacrilamida, fueron desnaturalizadas con el buffer de carga a 95°C por 5 min. Posteriormente fueron resueltas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), que consistió en un gel separador al 10 % y un gel concentrador al 5%, esto en un periodo de aproximadamente 2

horas a 80 volts. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF, por 2 horas aproximadamente a 120 volts, en frío y en agitación. Una vez terminada la transferencia la membrana fue teñida con el reactivo Rojo de Ponceau, con la finalidad de evaluar la integridad de las proteínas transferidas. Posteriormente la membrana se sometió a lavados para eliminar el colorante, se bloqueó con leche al 2% por una hora y se realizaron lavados para eliminar el exceso de leche. La membrana fue incubada con los anticuerpos primarios anti-MnSOD, anti-CuZnSOD, anti-Catalasa y anti- $\beta$  actina, a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 10 min. cada uno con buffer TBS 1X al 0.1% Tween. A continuación se adicionó el anticuerpo secundario correspondiente a cada anticuerpo primario y se dejó incubando y en agitación por 2 horas. Para finalizar se realizaron 3 lavados con buffer TBS-Tween 1x y se procedió con el revelado. La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo fue visualizada empleando un kit de Quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnologies y se tomó la imagen por un fotodocumentador de quimioluminiscencia de Bio Rad utilizando el software Quantity One.

## **5.8 Análisis de Datos**

Los experimentos se realizarán por triplicado y las variables fueron evaluadas mediante T de student de variables independientes (SPSS 15.0v). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de  $p \leq 0.05$ .

## **VI. RESULTADOS**

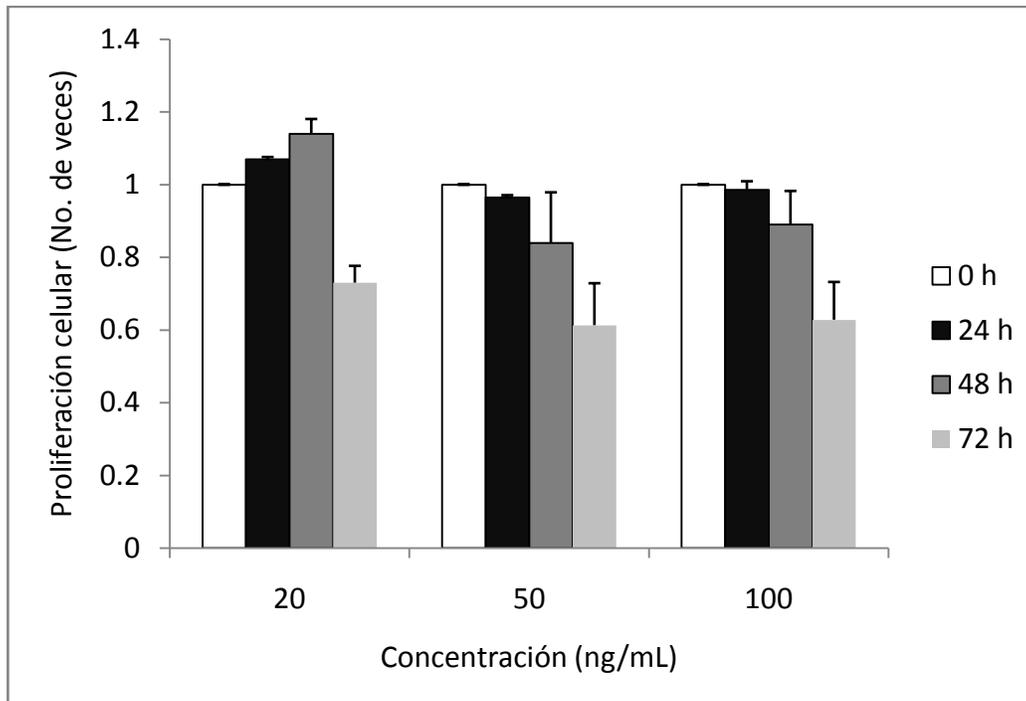
### **6.1 Ensayo de Viabilidad Celular**

Con la finalidad de evaluar la respuesta y la viabilidad de las células Huh-7 replicón al ser expuestas a distintas cantidades de HGF, se realizó el ensayo de viabilidad celular, utilizando el reactivo azul alamar, el cual es un indicador aprobado de viabilidad celular que utiliza el poder reductor natural de las células viables para convertir la resazurina (azul) en resorufina (rojo), un compuesto que puede ser medido por colorimetría. Las células viables convierten continuamente la resazurina en resorufina, generando de este modo, una medida cuantitativa de la viabilidad y la citotoxicidad [75-76].

En el ensayo realizado, se probaron 3 concentraciones distintas de HGF, 20, 50 y 100 ng/ml, a diferentes tiempos de exposición 0, 24, 48 y 72 horas. Los resultados muestran que a través del tiempo la viabilidad celular se mantiene estable hasta el tiempo de 72 horas en donde observamos hasta un 70 % de viabilidad comparado con el control sin tratamiento del tiempo evaluado (ver Gráfica 1). El porcentaje de viabilidad fue adecuado en los distintos tiempos evaluados, es decir se mantuvo estable; sin embargo, no se observó un aumento significativo en la proliferación de las células al ser tratadas con el HGF, a ninguna de las concentraciones evaluadas.

Se optó por utilizar la concentración de 50 ng/mL, debido a que es la que posee un mayor efecto terapéutico en los diferentes modelos presentados en

los antecedentes; además, la viabilidad celular no se vio afectada, como se mencionó anteriormente.



Gráfica 1. Viabilidad celular. Las barras representan el No. de veces de proliferación en comparación con el tiempo de 0 horas al cual se le dio el valor de 1.

## 6.2 Cuantificación del RNA del VHC por PCR en Tiempo Real

Para el ensayo de PCR en tiempo real, se extrajo RNA total de células tratadas y no tratadas con HGF 50 ng/mL a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Se realizó la RT-PCR, posteriormente se cuantificó el cDNA obteniéndose las concentraciones mostradas en la tabla 3.

Concentración en ng/uL		
Tiempo (horas)	Sin tratamiento	HGF (50 ng/mL)
0	345.7	--
	365.2	
	348.7	
6	348.9	350.7
	351	337.4
	340.7	344.6
12	337.4	340.4
	336.3	360.8
	335.9	356.2
24	369	370.9
	386	369
	368.8	377.4
48	372.1	349.9
	349.5	381.7
	361.8	364.2
72	371.8	354.6
	378	345.3
	371.8	367.8

Tabla 3. Cuantificación de cDNA del ensayo de RT-PCR.

Se muestran los triplicados de cada experimento.

Una vez obtenido el cDNA se realizaron diluciones de éste con la finalidad de utilizar 2.5 ul conteniendo 50 ug de cDNA para el ensayo de PCR en tiempo real, en el caso de las dos cuantificaciones, VHC y  $\beta$ -actina.

Con la finalidad de estandarizar la cantidad de cDNA necesario para la reacción de PCR en tiempo real, se realizó una escalera de diferentes cantidades de cDNA que fueron 10, 100 y 1000 ng. obteniendo valores de Ct aceptables en todos ellos. Se eligió la cantidad de 50 ng para las cuantificaciones de los ensayos.

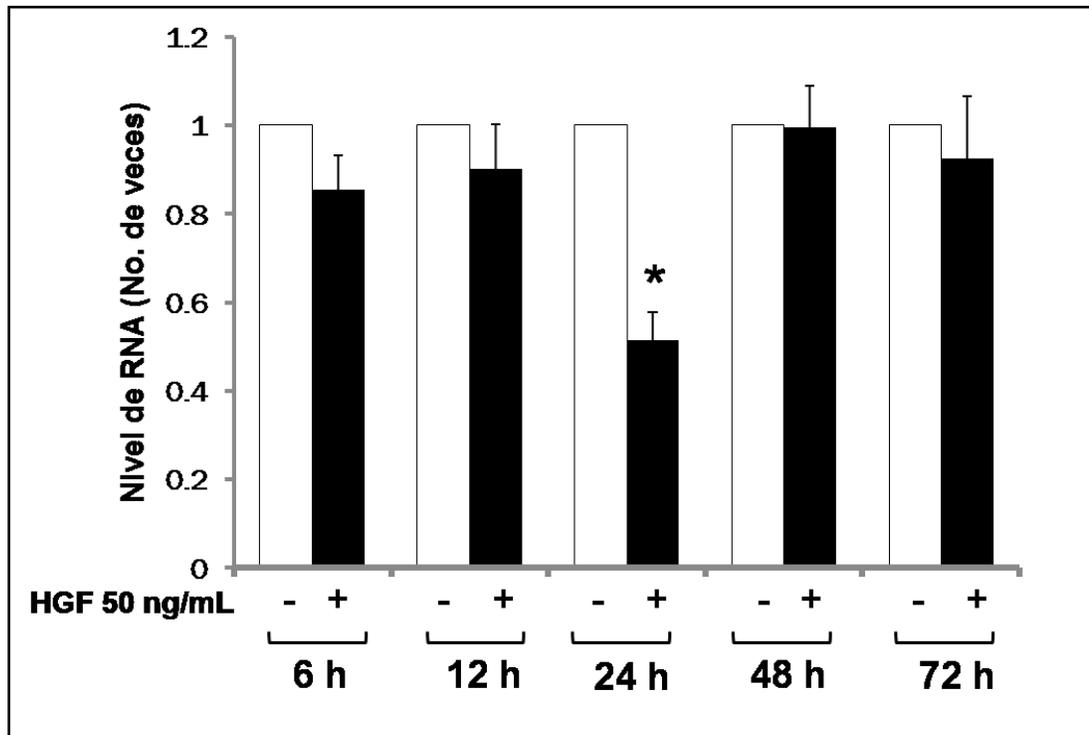
Se realizó la PCR en tiempo real de todos los tiempos obtenidos, en la gráfica 2 se presentan los datos arrojados una vez hecho el cálculo de  $\Delta\Delta Ct$  y en la tabla 3 y 4 se presentan los valores de Ct correspondientes a VHC y  $\beta$ -actina. Se observa una disminución a partir de las 6 horas de exposición a HGF en comparación con el control sin tratamiento, manteniéndose a las 12 horas y siendo mas evidente a las 24 horas con una disminución de hasta el 50 % del nivel de RNA en comparación con el control sin tratamiento, siendo estadísticamente significativo con un valor  $p < 0.05$ .

<b>Tiempo</b>	<b>Sin tratamiento</b>	<b>HGF (50ng/mL)</b>
<b>0</b>	23.00	--
<b>6</b>	23.20	22.77
<b>12</b>	23.05	22.38
<b>24</b>	20.95	21.07
<b>48</b>	21.54	20.68
<b>72</b>	20.16	20.92

Tabla 4. Valores promedio de Ct de la cuantificación del RNA del VHC.

<b>Tiempo</b>	<b>Sin tratamiento</b>	<b>HGF (50ng/mL)</b>
<b>0</b>	21.46	
<b>6</b>	21.92	21.31
<b>12</b>	22.25	21.59
<b>24</b>	22.25	20.51
<b>48</b>	22.41	21.67
<b>72</b>	21.96	22.50

Tabla 5. Valores promedio de Ct de la cuantificación de  $\beta$ -actina.

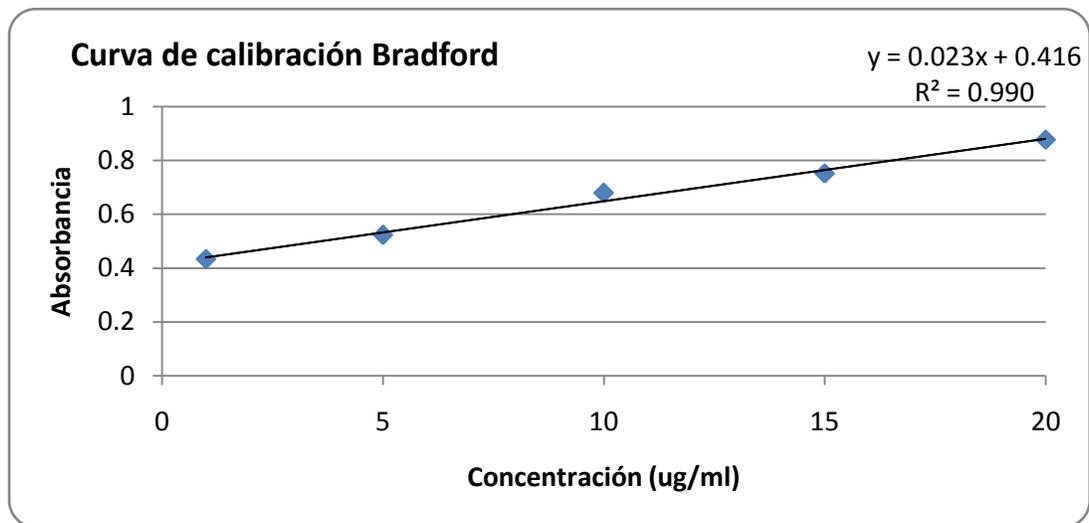


Gráfica 2. Cuantificación relativa de RNA de VHC, medida por PCR en tiempo real utilizando  $\beta$ -actina como gen normalizador. \* $p < 0.05$

Sin embargo, el nivel de RNA del virus se ve recuperado a partir del tiempo de 48 horas manteniéndose cerca del nivel observado en células que no fueron tratadas con HGF.

### 6.3 Evaluación del Efecto del HGF sobre los Niveles de Expresión de la Proteína Viral NS5A

Para evaluar la respuesta a la exposición a HGF a nivel traduccional, se extrajo proteína a las 0, 24, 48 y 72 horas posteriores a la exposición a HGF 50 ng/mL. se cuantificó la proteína utilizando el método de Bradford y para ello se construyó una curva de estándares que se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 3. Curva de calibración de Bradford. Las mediciones se realizaron por triplicado y se grafica la media de ellas. Se muestra en la esquina superior derecha la ecuación de la recta utilizada y el valor de R.

Una vez cuantificada la proteína se utilizaron 40 ug para correr el gel de poliacrilamida al 10 % (gel separador). Posteriormente se realizó la transferencia del gel a la membrana de PVDF y se procedió con el inmunoblot, el resultado de la reacción de quimioluminiscencia se muestra en la figura 13.

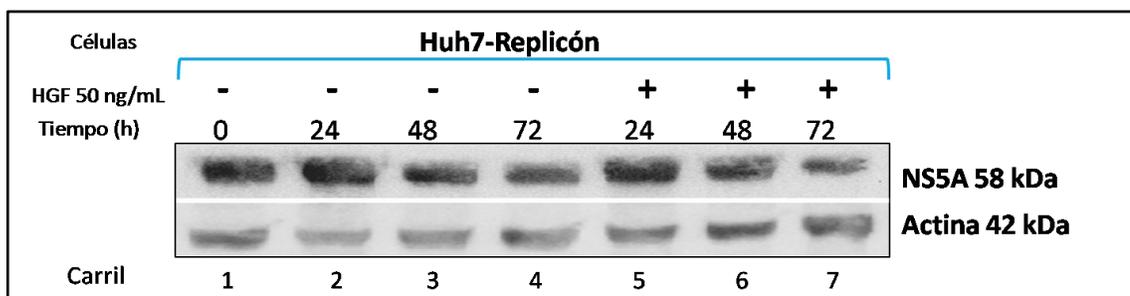
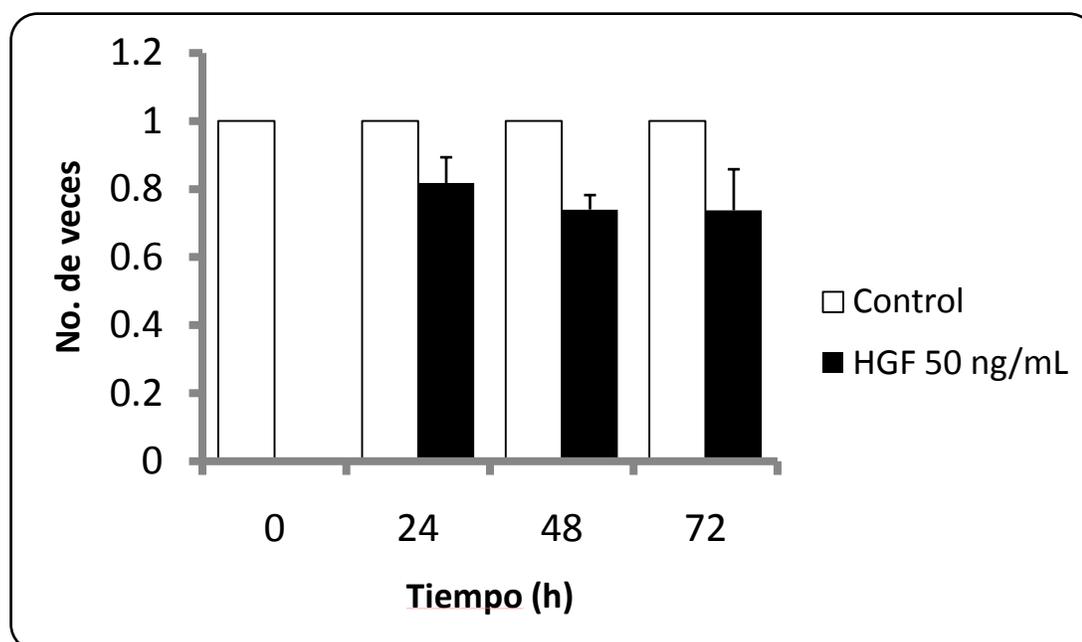


Figura 13. Western blot de la proteína viral NS5A. Imagen representativa del triplicado de ensayos.

Se realizó el análisis densitométrico del triplicado de imágenes y se normalizaron los resultados obtenidos con  $\beta$ -actina. El software utilizado para el análisis fue el ImageJ versión 1.44 p. En la gráfica 4 se presenta el resultado global.

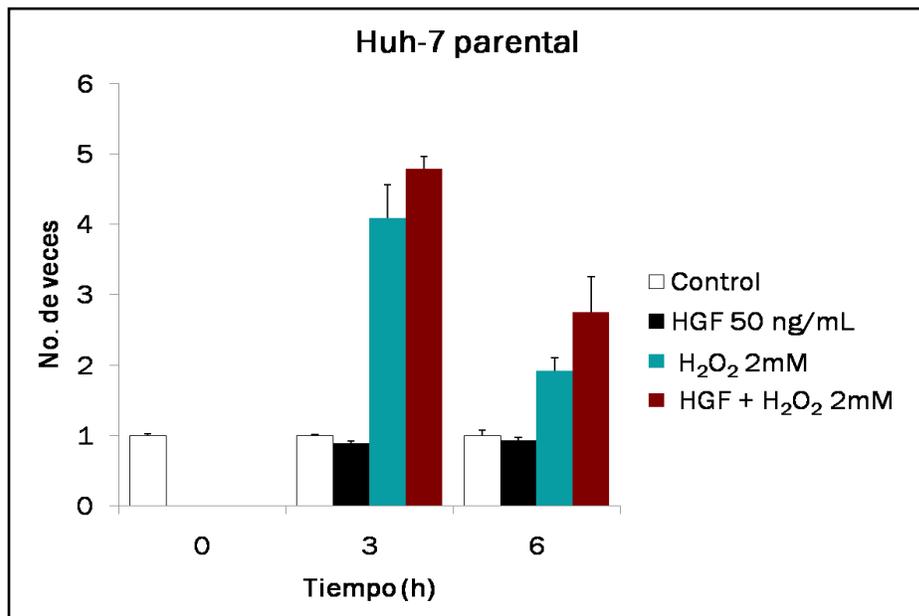


Gráfica 4. Análisis densitométrico del triplicado del Western blot de la proteína viral NS5A. Los datos fueron normalizados con  $\beta$ -actina y posteriormente se compararon con su correspondiente control sin tratamiento dándole el valor de 1 a este último.

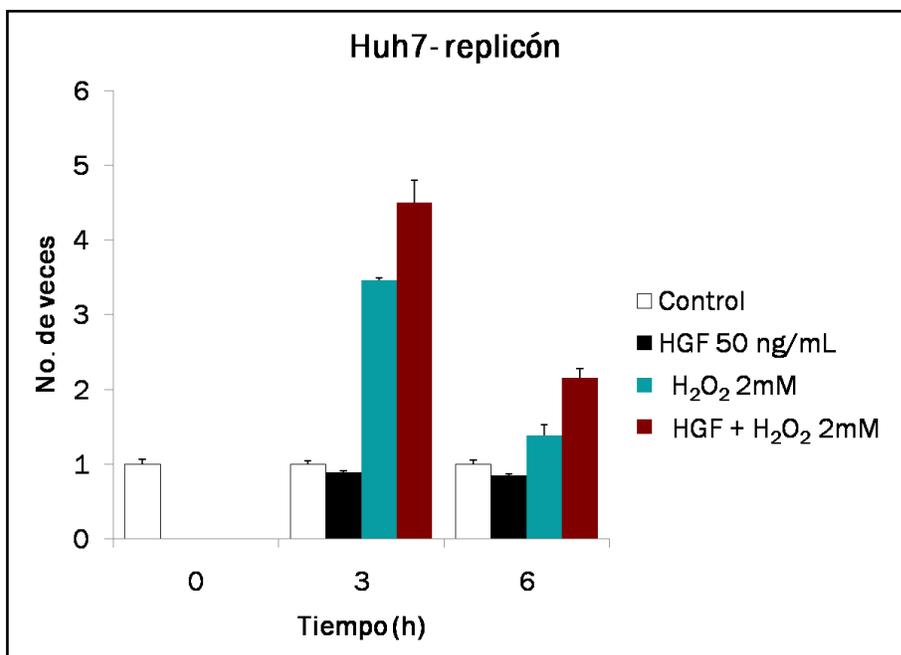
En la gráfica 4 podemos observar que no hay una disminución significativa del nivel de la proteína viral NS5A; sin embargo, se puede observar una tendencia a la disminución en los niveles de dicha proteína.

#### 6.4 Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno

Para este propósito se utilizaron placas especiales para determinar fluorescencia, y se evaluó la respuesta a tiempos cortos; posteriores al pretratamiento con HGF. Se evaluó la respuesta al daño con  $H_2O_2$  2mM, a las 0, 3 y 6 horas de exposición a este agente, el cual produce radicales libres en la célula, los cuales pueden ser medidos por el método de la diclorofluoresceína. Se evaluó también la respuesta en células parentales como control.



Gráfica 5. Determinación de ROS en células Huh-7 parental. Fueron pretratadas con HGF 50 ng/mL por 12 horas y posteriormente expuestas a  $H_2O_2$  2mM por 3 y 6 horas.



Gráfica 6. Determinación de ROS en células Huh-7 replicón. Fueron pretratadas con HGF 50 ng/mL por 12 horas y posteriormente expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2mM por 3 y 6 horas.

En ambas líneas celulares se observa el mismo comportamiento, observamos claramente como las células que están en contacto con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentan niveles mayores de fluorescencia, lo que es directamente proporcional a las especies reactivas de oxígeno presentes en la célula. Esto en comparación con los niveles presentes en el control sin tratamiento y en lo observado con el pre-tratamiento con HGF. Observamos que el pre-tratamiento con HGF no evitó ni aminoró la generación de especies reactivas de oxígeno al exponer las células a peróxido de hidrógeno.

## 6.5 Determinación de Proteínas Oxidadas Totales

Las proteínas oxidadas poseen un grupo carbonilo, el cual puede ser derivatizado con la finalidad de añadir un grupo metilo, útil para la identificación específica del total de dichas proteínas por Western blot. Este método, llamado Oxiblot, es útil para evaluar estrés oxidativo en la célula a nivel proteico.

Se evaluaron las dos líneas celulares, replicón y parental como control, no tratadas y tratadas con HGF.

A diferencia de lo observado a tiempos cortos con las especies reactivas de oxígeno, las proteínas oxidadas disminuyen de manera significativa en el caso de las células tratadas con HGF, como se puede observar en el caso de parental, figura 14 y gráfica 6 y en el caso de replicón, figura 15 y gráfica 7.

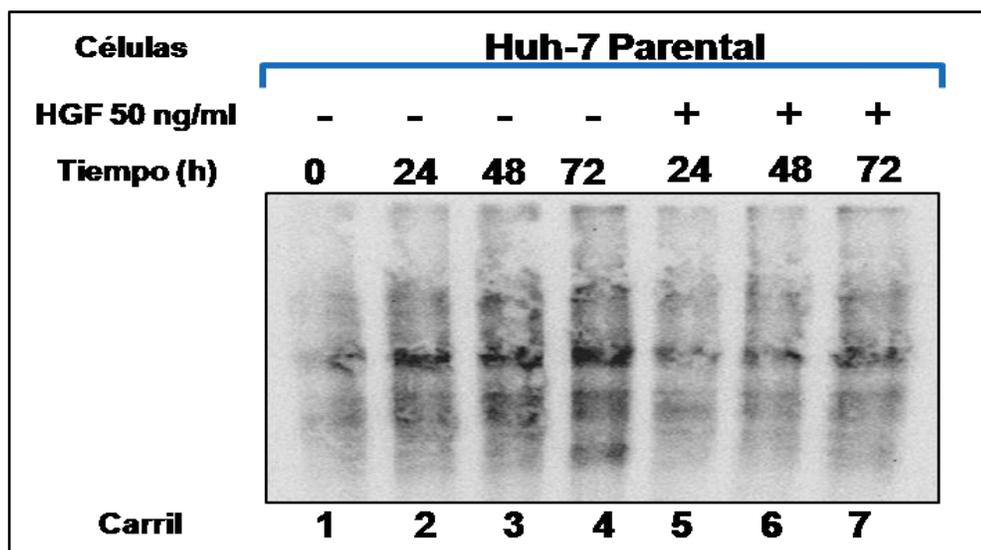
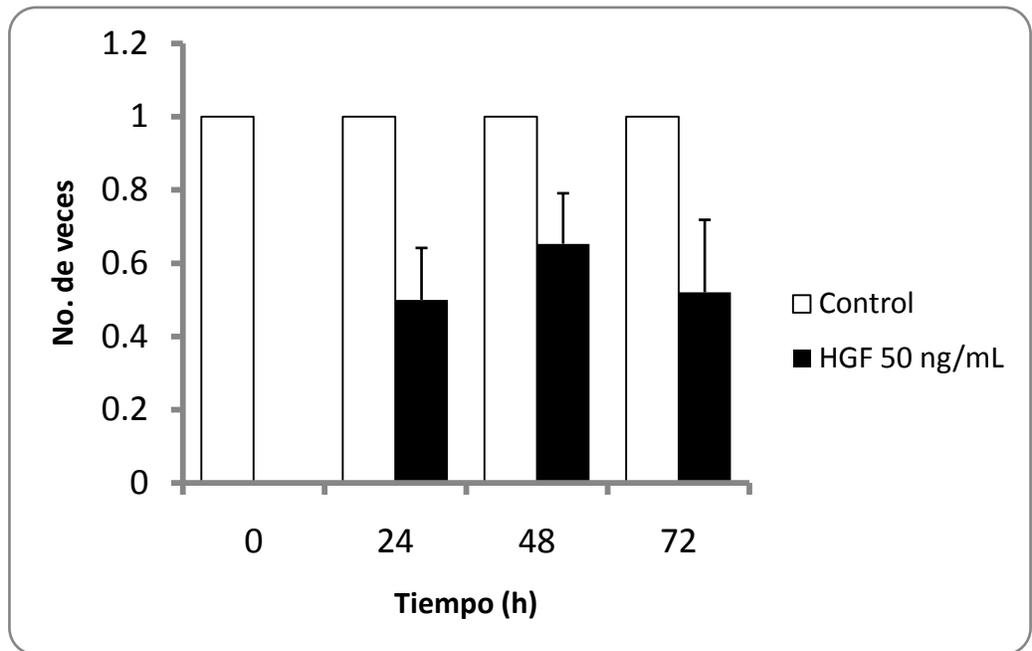


Figura 14. Oxiblot de células Huh-7 parental en presencia y ausencia de HGF 50 ng/mL



Gráfica 7. Análisis densitométrico del triplicado de Oxiblots realizado para la línea celular Huh-7 parental.

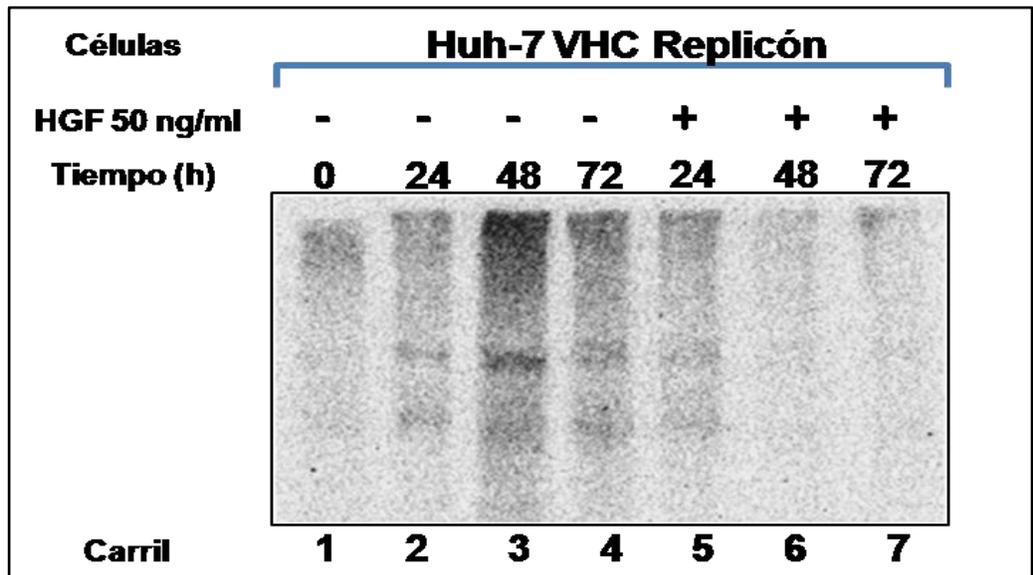
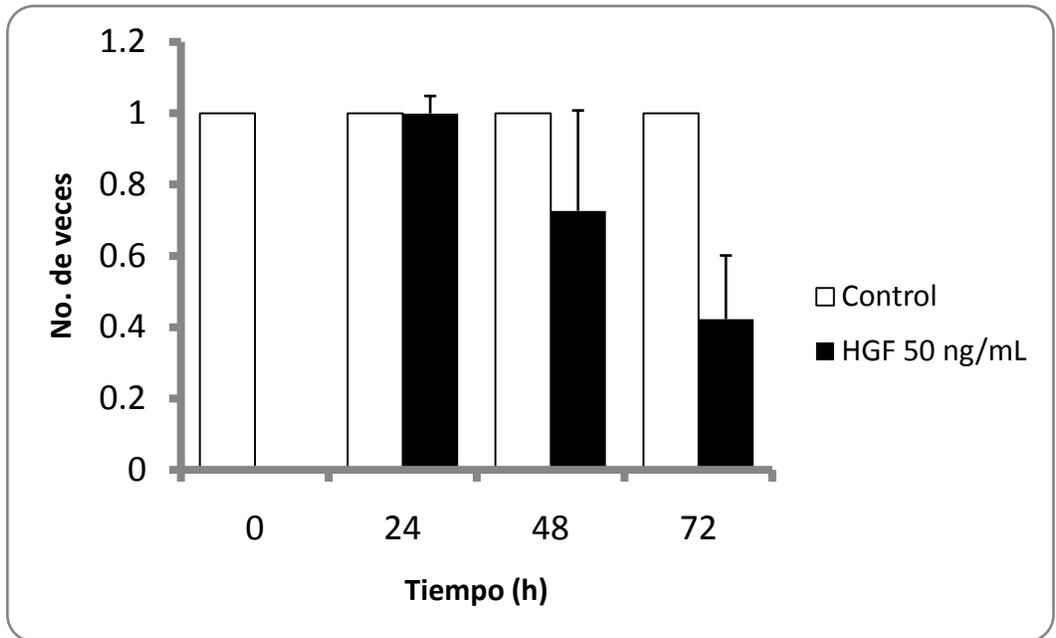


Figura 15. Oxiblot de células Huh-7 replicón en presencia y ausencia de HGF 50 ng/mL



Gráfica 8. Análisis densitométrico del triplicado de Oxiblots realizado para la línea celular Huh-7 replicón

## **6.6 Nivel de proteínas antioxidantes SOD-1, SOD-2 y Catalasa**

Con la finalidad de evaluar la participación de las proteínas antioxidantes SOD-1, SOD-2 y catalasa en el comportamiento observado en la expresión del VHC con el tratamiento con HGF, se evaluó a nivel traduccional la producción de estas enzimas. Se extrajo la proteína total a las 0, 24, 48 y 72 horas de las células tratadas y no tratadas con HGF, se evaluaron las 2 líneas celulares, replicón, y parental como control. Se cuantificó la proteína por el método de Bradford utilizando la curva de calibración mostrada anteriormente. Se realizaron Western blots para cada una de las proteínas antioxidantes mencionadas.

Se analizó el comportamiento a nivel traduccional de la SOD-1 que corresponde a la dismutasa citosólica. En células Huh-7 parental, se observa un aumento en el nivel de esta enzima como se puede observar en la figura 16 y su correspondiente gráfica 8 del análisis densitométrico realizado para el triplicado de los ensayos.

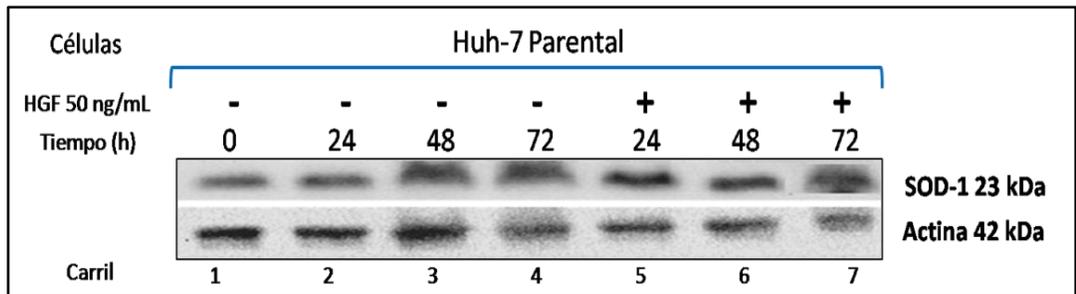
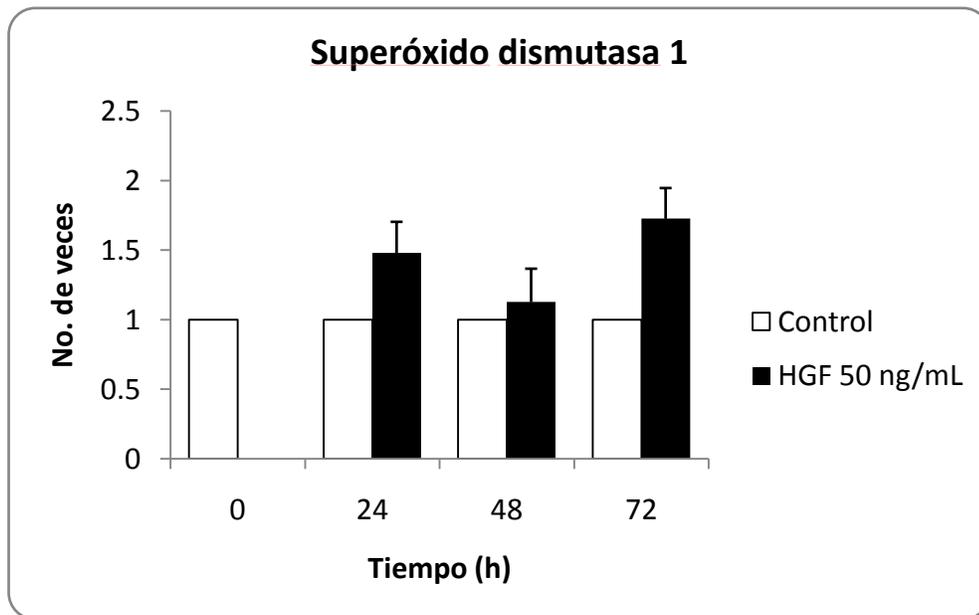


Figura 16. Western blot de la proteína antioxidante SOD-1 para células Huh-7 parental.



Gráfica 9. Análisis densitométrico del nivel de la proteína SOD-1 en células Huh-7 parental. Se comparan las células tratadas con las no tratadas a las cuales se les asignó el valor de 1.

Por otro lado, se analizó el comportamiento del nivel de dicha proteína en células Huh-7 replicón. Observándose un comportamiento distinto al de las células parental, se muestra la figura 17 que corresponde a la representativa del triplicado y la gráfica 9 que corresponde al análisis densitométrico.

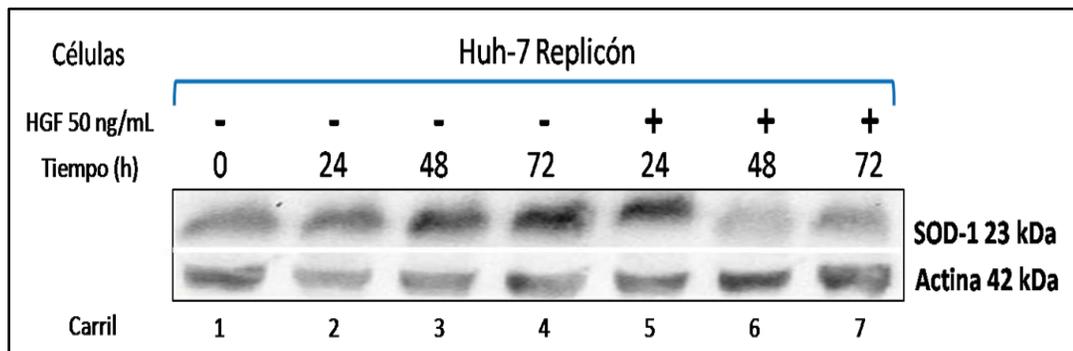
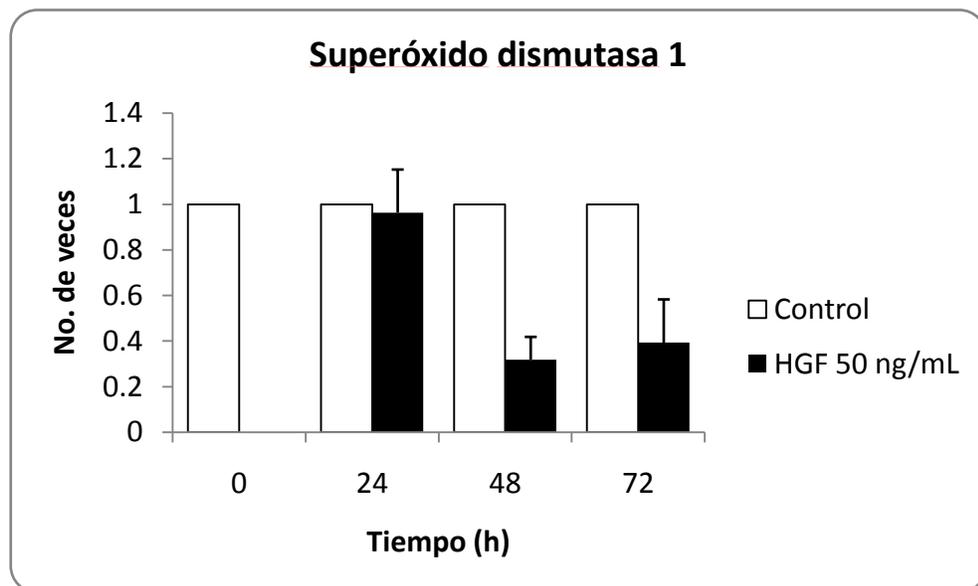


Figura 17. Western blot de la proteína antioxidante SOD-1 para células Huh-7 replicón



Gráfica 10. Análisis densitométrico del nivel de la proteína SOD-1 en células Huh-7 replicón. Se comparan las células tratadas con las no tratadas a las cuales se les asignó el valor de 1.

Se evaluó también el nivel de la proteína SOD-2 que corresponde a la dismutasa mitocondrial. En el caso de las células Huh-7 parental, se observó un aumento en el nivel de la expresión de dicha proteína, como se observa en la figura 18 y en el análisis densitométrico correspondiente en la gráfica 10.

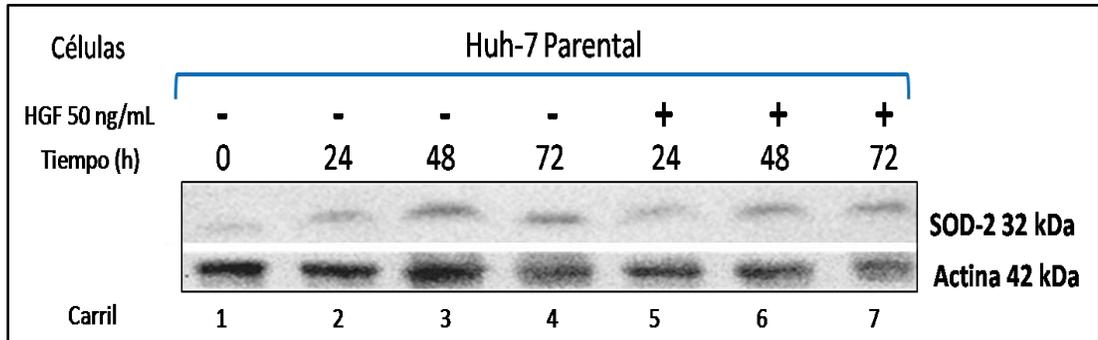
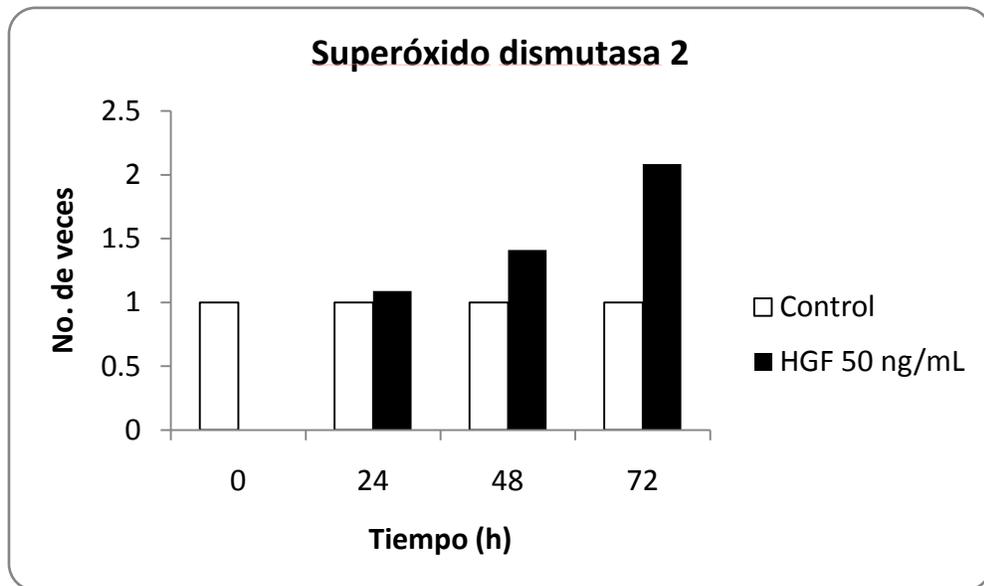


Figura 18. Western blot de la proteína antioxidante SOD-2 para células Huh-7 parental.



Gráfica 11. Análisis densitométrico del nivel de la proteína SOD-2 en células Huh-7 parental. Se comparan las células tratadas con las no tratadas a las cuales se les asignó el valor de 1.

En el caso de las células replicón, que expresan las proteínas virales, no se observa un aumento en la expresión como en las células parentales; al contrario parecer ser que disminuye al inicio y posteriormente vuelve a sus niveles de expresión basales. Figura 19 y gráfica 11.

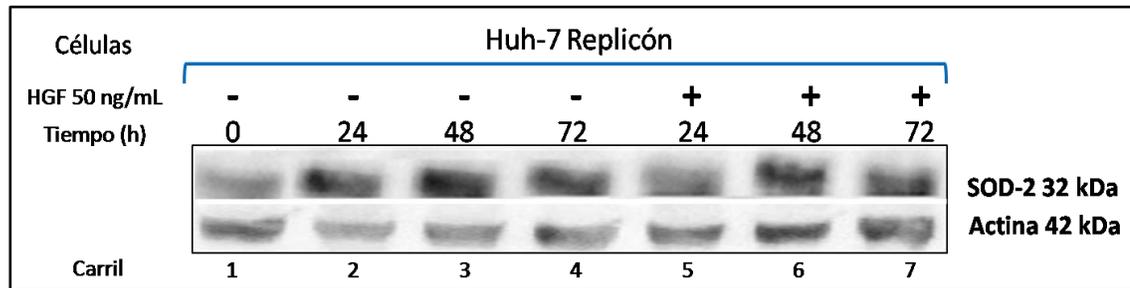
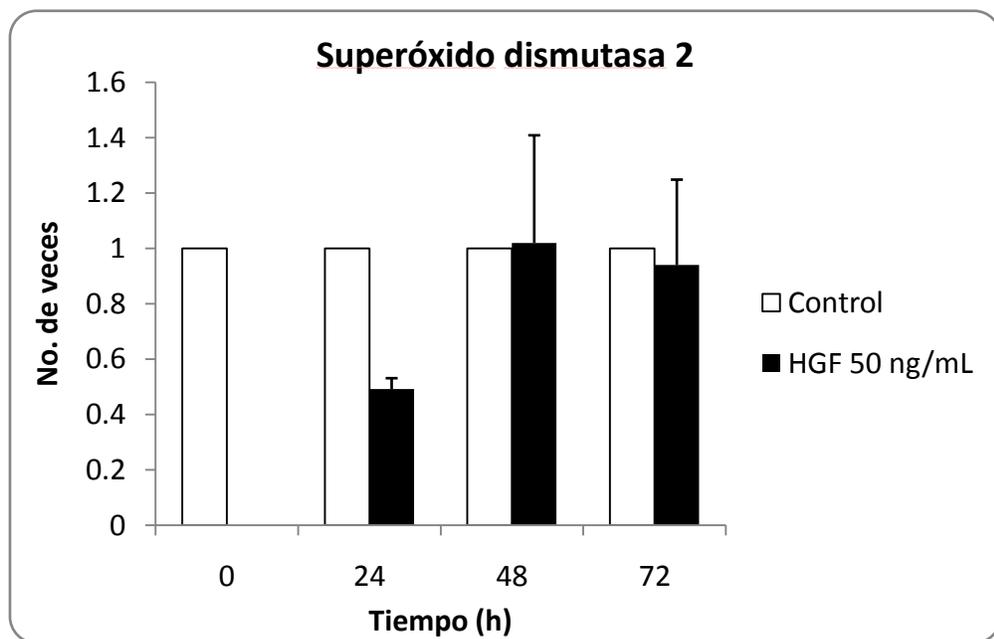


Figura 19. Western blot de la proteína antioxidante SOD-2 para células Huh-7 replicón.



Gráfica 12. Análisis densitométrico del nivel de la proteína SOD-2 en células Huh-7 replicón. Se comparan las células tratadas con las no tratadas a las cuales se les asignó el valor de 1.

Por último se evaluó el nivel de la proteína catalasa, la cual presentó un comportamiento similar al presentado por la SOD-1 y la SOD-2, en el caso de la línea celular parental. Se observó un aumento del nivel de esta proteína al ser tratada con HGF 50 ng/mL, como se puede representar en la figura 20 y en el análisis densitométrico en la gráfica 12.

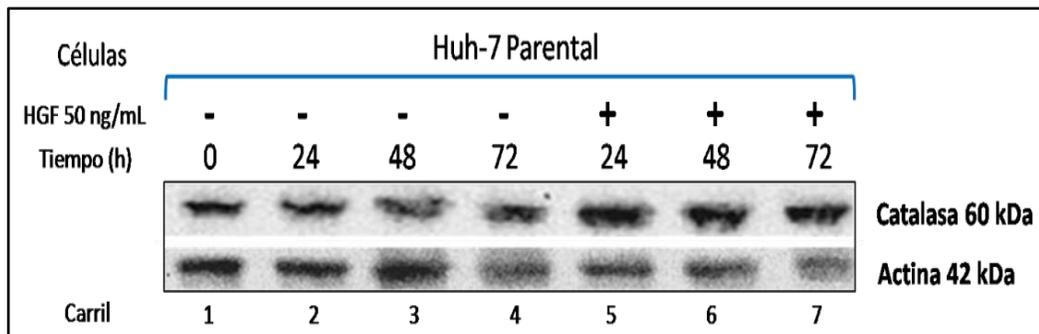
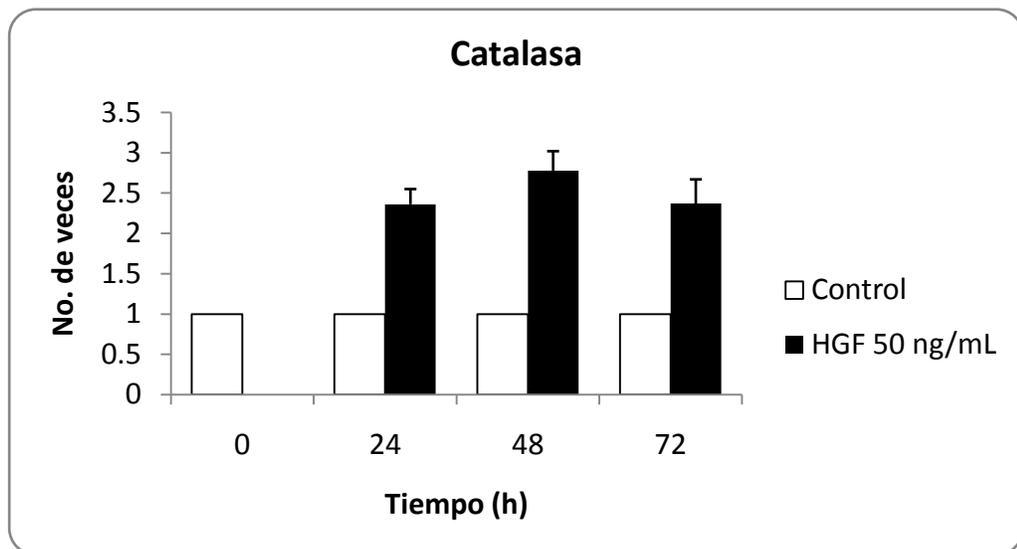


Figura 20. Western blot de la proteína antioxidante Catalasa para células Huh-7 parental.



Gráfica 13. Análisis densitométrico del nivel de la proteína Catalasa en células Huh-7 parental. Se comparan las células tratadas con las no tratadas a las cuales se les asignó el valor de 1.

En el caso del nivel de catalasa en la línea celular replicón, se mantiene en niveles basales sin ningún cambio aparente al ser tratadas con HGF 50 ng/mL. Figura 21 y gráfica 13.

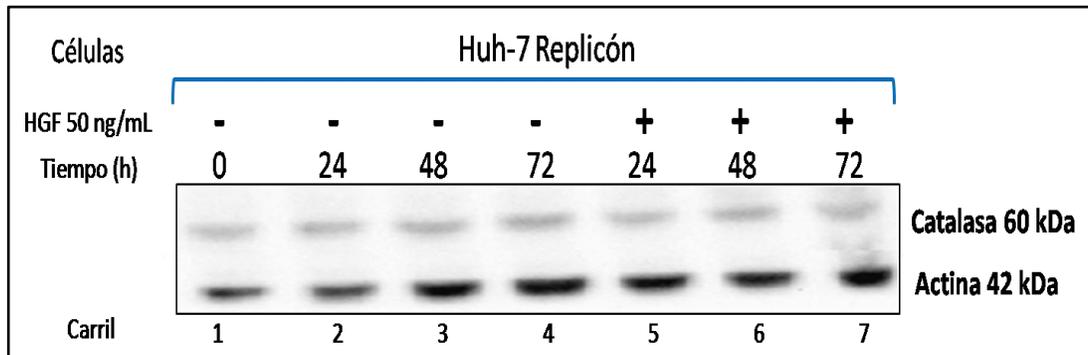
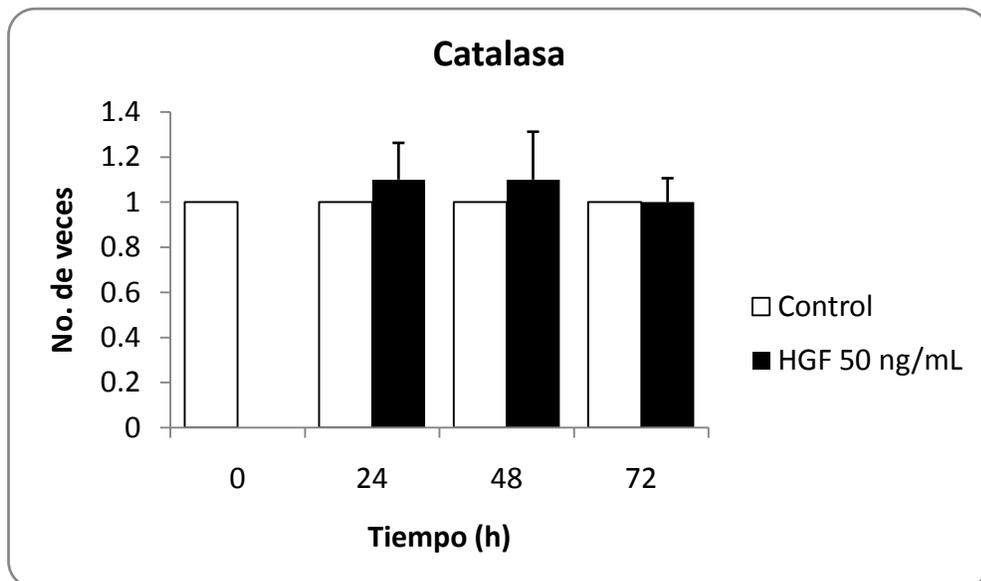


Figura 21. Western blot de la proteína antioxidante Catalasa para células Huh-7 replicón.



Gráfica 14. Análisis densitométrico del nivel de la proteína Catalasa en células Huh-7 replicón. Se comparan las células tratadas con las no tratadas a las cuales se les asignó el valor de 1.

## VII. DISCUSIÓN

La infección por el virus de la hepatitis es actualmente la causa más frecuente de hepatitis crónica en nuestro país, con una prevalencia cercana al 3% [77] y en aumento progresivo debido a múltiples factores. Es fácil comprender el enorme problema sociosanitario dado que el riesgo de cronicidad está en torno al 80%; y de ellos, un 10-25% desarrollarán cirrosis a los 20-30 años de evolución con el consiguiente riesgo de mortalidad relacionada con la propia cirrosis y/o aparición de hepatocarcinoma [5, 78].

Actualmente, el tratamiento de la hepatitis crónica por VHC consiste en la combinación de interferón  $\alpha$  pegilado y ribavirina. Con ello, se consigue una respuesta virológica sostenida en el 45-55% de los pacientes con genotipo 1, cercana al 65-70% en los sujetos con genotipo 4 y del 75-90% de los pacientes con genotipo 2 ó 3 [23, 25].

El mecanismo molecular de la patogénesis del VHC sigue siendo poco claro. Sin embargo, el estrés oxidativo se ha convertido en un jugador clave en el desarrollo y la progresión de muchos estados patológicos, incluyendo la patogénesis del hígado inducida por el VHC [41, 44, 46].

El estrés oxidativo altera a lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, inhibe enzimas y deteriora el metabolismo y la viabilidad celular. Un nivel alto de estrés oxidativo es común en los pacientes en hemodiálisis (HD), y contribuye al desarrollo de números desordenes. Por otro lado, es posible que estas lesiones inespecíficas evoquen una reacción de reparación en el organismo, una parte de la cual es el incremento de la síntesis de la citocina

mitógena, morfogénica, y antiapoptótica, el HGF [73]. A pesar de que los niveles endógenos de HGF se elevan después de la lesión del tejido, los niveles son bajos cuando ocurre el daño. Además, los niveles altos y sostenidos de HGF son necesarios para la subsecuente reparación de tejidos. Por lo tanto, el uso de HGF exógeno como terapia puede ser un tratamiento eficaz para la prevención de la lesión de los tejidos y para promover su reparación [79]. Además, a este factor de crecimiento, se le han atribuido propiedades antioxidantes, las cuales han sido evaluadas en distintos modelos[69, 72-73].

Por otro lado, la posible relación que posee este factor y la infección con el virus de la hepatitis C, es desconocida. Hay evidencias de que el HGF tiene un papel, en la disminución sérica del VHC en pacientes con hepatitis C crónica que se encuentran en tratamiento con hemodiálisis. Este factor se ha encontrado elevado durante el procedimiento de diálisis y posterior a ello se observa una disminución en la carga viral de los pacientes evaluados [30, 74]. Varios mecanismos se han propuesto para explicar la reducción de la concentración de RNA del VHC en suero: la adsorción de las partículas virales en las membranas de hemodiálisis[80], la filtración de los viriones en el líquido de diálisis [81], y la inducción de interferón alfa durante la diálisis que inhibe la replicación de VHC [82]. El trabajo realizado por Barril y cols. en el 2010 descarta la hipótesis de la adsorción de las partículas en las membranas ya que se evaluó la respuesta con diferentes tipos de membranas y en diferentes protocolos de diálisis y no se observaron diferencias significativas entre las variables.

En el presente trabajo se evaluó la participación del HGF en la expresión del VHC a nivel RNA y proteínas, con la finalidad de de determinar si este factor de crecimiento tiene algo que ver con la disminución del RNA viral.

En primera instancia, se evaluó el efecto del HGF sobre la proliferación en las células Huh-7 replicón, las cuales expresan de manera estable y constitutiva las proteínas no estructurales del VHC. Se les dio el tratamiento a las células con diferentes concentraciones de HGF, 20, 50 y 100 ng/mL, en las 3 concentraciones evaluadas se observó el mismo comportamiento, la viabilidad celular se mantiene estable durante las 24 y 48 horas post tratamiento y a las 72 horas disminuye al 70 %, se consideró aceptable la viabilidad celular lograda, y se eligió la concentración de 50 ng/mL para trabajar en los experimentos siguientes. Además, se pudo comprobar que el comportamiento en la proliferación fue similar al reportado para las células Huh-7 parentales. Por otro lado, se comparó la respuesta al HGF de las células Huh-7 contra las células de hepatocarcinoma HepG2 reportada por Lee y cols. en donde se observa como las células HepG2 aumentan sus niveles de proliferación al ser expuestas a distintas concentraciones de HGF [83], lo que no sucede con la línea celular Huh-7 replicón evaluada en este trabajo. Algunos reportes por el contrario, mencionan que el HGF inhibe el crecimiento de algunas líneas celulares de hepatoma [84-85].

En cuanto a la replicación viral, se encontró que ésta disminuye por efecto del tratamiento con el HGF. En las primeras horas evaluadas, 6 y 12 h se observa una disminución de alrededor del 10% en comparación con los controles sin tratamiento. Al tiempo de 24 horas post exposición se observó una

disminución de hasta 50 % del RNA del VHC, siendo este un hallazgo importante para determinar si este factor participa de alguna manera en la disminución de la carga viral en los pacientes con hemodiálisis. Sin embargo, el nivel de RNA viral se ve recuperado a niveles basales a las 48 y 72 horas de iniciado el tratamiento, esto puede deberse a que el HGF posee un tiempo de vida media muy corto, y no es capaz de mantener el efecto durante tiempos muy largos. Por el momento desconocemos el mecanismo por el cual el HGF ejerza ese efecto sobre la replicación del VHC. A la par se evaluó el efecto de este factor sobre la traducción de las proteínas virales por western blot, usando como indicador la proteína viral NS5A. La disminución observada en los niveles de la proteína viral no fue significativa; sin embargo, se puede constatar una tendencia a la disminución del nivel de esta proteína, lo que sugiere que el HGF participa en la disminución pero de manera parcial.

Con la finalidad de averiguar si el efecto causado por HGF sobre la expresión del virus se debía a su participación en la modulación del estrés oxidativo, se evaluaron distintos parámetros.

Por un lado se evaluó la participación del HGF sobre la generación de especies reactivas de oxígeno, en este caso, no se observó un efecto inhibitorio sobre las ROS. En las dos líneas celulares, parental y replicón, el pre-tratamiento con HGF no fue capaz de disminuir el estrés generado por un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno, usado como control positivo de daño en este estudio. Se ha evaluado el efecto del HGF sobre las ROS en distintos modelos, en donde la generación de éstas es inhibida por acción del tratamiento con HGF [71-72]. Sin embargo, las técnicas usadas para evaluarlo

han sido distintas a la usada en este trabajo, además de la concentración y los tiempos de exposición al peróxido de hidrógeno, este puede ser un factor determinante en la discrepancia de los datos obtenidos.

Como se mencionó antes, uno de los daños generados en el estrés oxidativo es la oxidación de proteínas, las cuales pierden su función al ser dañadas de esta manera. En este trabajo se evaluó el nivel de proteínas oxidadas totales, las cuales presentaron un cambio al ser tratadas con el factor de crecimiento de hepatocitos. En las dos líneas celulares se observa una disminución con respecto al tiempo de las proteínas oxidadas, siendo estadísticamente significativa, al tiempo de 72 horas. Como se mencionó antes, las ROS no fueron inhibidas por el HGF, es por ello que la disminución en las proteínas oxidadas no esta relacionada a este hallazgo. Se sabe que las proteínas oxidadas son enviadas a degradación por proteasoma, ya que tienden a acumularse y formar agregados que son nocivos para la célula[86], es posible que las proteínas oxidadas disminuidas que estamos observando, estén siendo degradadas solamente, en vez de que la oxidación de proteínas este disminuyendo por efecto del HGF, sin embargo, se requieren ensayos para asegurar que esto sea lo que en realidad está sucediendo.[87]

Se evaluó por ultimo el nivel de proteínas antioxidantes en las líneas celulares parental y replicón y el efecto que el HGF ejerció sobre su expresión. Reportes previos indican que el HGF fue capaz de estimular la expresión de enzimas antioxidantes como, la Cu/Zn superóxido dismutasa y la catalasa[72]. En este trabajo se encontró que el HGF es capaz de estimular las proteínas antioxidantes mencionadas solo en la línea celular Huh-7 parental, se observó

un aumento con respecto al tiempo en las 3 enzimas antioxidantes evaluadas (SOD-1, SOD-2 y Catalasa) al ser tratadas con el HGF. Por otro lado, en células que expresan las proteínas del virus se observa el efecto contrario en el caso de la SOD-1 y en el caso de la SOD-2 y Catalasa no existen cambios significativos en cuanto a su expresión, es por ello que sugerimos que la presencia de las proteínas virales pudiera estar afectando en la respuesta antioxidante provocada por el HGF. Con estos resultados podemos complementar lo encontrado con la disminución de las proteínas oxidadas, ya que al no haber un estímulo en la expresión de enzimas antioxidantes, estas no están participando directamente en la disminución de las proteínas oxidadas.

Por lo tanto, proponemos que los sistemas antioxidantes evaluados no están directamente relacionados con la regulación negativa a nivel traduccional y/o postraduccional ejercida por el HGF sobre la expresión del VHC.

Al observarse simultáneamente la disminución de las proteínas virales así como de las proteínas oxidadas cabe la posibilidad de que estos eventos guarden relación entre sí. Es posible que existan otros mecanismos alternativos para disminuir el daño celular inducido por las proteínas oxidadas, como la activación del sistema de degradación en proteasoma.

## VIII. CONCLUSIONES

- ✓ El HGF no presenta un efecto mitogénico en las células Huh-7 parentales ni en la replicación, a diferencia de otras líneas celulares de hepatoma que si son estimuladas por este factor de crecimiento.
- ✓ El efecto del HGF sobre los niveles de RNA-VHC es dependiente del tiempo de exposición, mostrando una disminución del 50% del RNA a las 24 horas ( $p < 0.05$ ); sin embargo, el nivel de RNA se ve recuperado a las 48 horas.
- ✓ El HGF modula a nivel traduccional, la expresión de la proteína viral de NS5A.
- ✓ La exposición al HGF disminuyó los niveles de proteínas oxidadas tanto en las células parentales, como en las células replicación. Sin embargo, esto no se ve reflejado en los niveles de especies reactivas de oxígeno.
- ✓ El HGF ejerce un efecto diferencial en la expresión de las enzimas antioxidantes SOD-1, SOD-2 y catalasa en las células Huh-7, aumentando su expresión en células parentales y disminuyendo (SOD-1) o no modificando significativamente su expresión (SOD-2 y catalasa) en células que expresan el VHC.

## **IX. PERSPECTIVAS**

- Comprobar la participación de los sistemas de ubiquitinación en los mecanismos de replicación e inhibición del VHC presentes en las células expuestas a HGF.
- Evaluar la participación de los mecanismos antioxidantes primarios y secundarios en la supervivencia de las células infectadas con RNA virus.

## X. REFERENCIAS

1. *Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium.* Journal of Viral Hepatology 1999; p. 35-47.
2. A Medhat , M.S., LS Magder, et al., *Hepatitis C in a community in Upper Egypt: risk factors for infection.* . Am J Trop Med Hyg, 2002. **66**: p. 633–638.
3. A Kane, J.L., M Zaffran, L Simonsen, M Kane. , *Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates.* . Bull World Health Organ 1999. **77**: p. 801–807.
4. *NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C.* NIH Consens State Sci Statements, 2002: p. 1-46.
5. José Luis Valdespino, C.J.C.-G., Gustavo Olaiz-Fernández, Oswaldo Palma, David Kershenobich, Jaime Sepúlveda., *Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿un problema de salud pública emergente? .* Salud Publica Mex, 2007.
6. Sabahi, A., *Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle.* Virology Journal, 2009. **6**.
7. Levrero, M., *Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C.* Oncogene, 2006. **25**: p. 3834–3847.
8. Group, T.G.B.o.H.C.W., *Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C.* J Clin Pharmacol, 2004. **44**: p. 20-29.
9. Highleyman, L., *Natural history and treatment of hepatitis C.* BETA. , 1999: p. 16-29.
10. Nahum Méndez Sánchez, D.M.K., Norberto C. Chavez Tapia, Jesús Bahena, Ricardo Correa Rotter, Misael Uribe, *Prevalence of Hepatitis C Virus Infection among Hemodialysis Patients at a Tertiary-Care Hospital in Mexico City, Mexico.* JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2005. **42**: p. 4321–4322.
11. Thomas DL, C.R., Shapiro CN, Hook EW 3rd, Alter MJ, Quinn TC. , *Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases.* . J Infect Dis 1994. **169**: p. 990-995.
12. Goldberg D, M.P., Smith R, Appleyard K, Dunlop J, Taylor A, Hutchinson S. , *Hepatitis C virus among high and low risk pregnant women in Dundee: unlinked anonymous testing.* Br J Obstet Gynaecol 2001. **108**: p. 365-370.
13. Vandelli C, R.F., Romano L, Tisminetzky S, De Palma M, Stroffolini T, Ventura E, Zanetti A. , *Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study.* . Am J Gastroenterol. 2004. **99** p. 855-859.
14. Simmonds P, H.E., Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS., *Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region.* J Gen Virol. , 1993. **74**: p. 2391-2399.
15. Simmonds P, B.J., Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes.* Hepatology. , 2005. **42**: p. 962-73.
16. Leroux-Roels G, D.E., Hulstaert F, Tobback L, Dincq S, Desmet J, Desombere I, Maertens G., *A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: tolerability and immunogenicity in healthy volunteers.* Vaccine. , 2004. **22**: p. 3080-6.
17. Nevens F, R.T., Van Vlierberghe H, Horsmans Y, Sprengers D, Elewaut A, Desmet V, Leroux-Roels G, Quinaux E, Depla E, Dincq S, Vander Stichele C, Maertens G, Hulstaert F., *A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C.*Hepatology, 2003. **38**: p. 1289-96.
18. Firbas C, J.B., Tauber E, Buerger V, Jelovcan S, Lingnau K, Buschle M, Frisch J, Klade CS., *Immunogenicity and safety of a novel therapeutic hepatitis C virus (HCV) peptide vaccine: a*

- randomized, placebo controlled trial for dose optimization in 128 healthy subjects. *Vaccine*. , 2006. **15**: p. 4343-53.
19. Polakos NK, D.D., Cox J, Ng P, Selby MJ, Chien D, O'Hagan DT, Houghton M, Paliard X., *Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine*. *J Immunol*, 2001 **166**: p. 3589-98.
  20. Darius Moradpour, F.P., Charles M. Rice., *Replication of hepatitis C virus*. *Nature Reviews-Microbiology*, 2007. **5**: p. 453-463.
  21. Seeff, L.B., J. H. Hoofnagle., *Appendix: The National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C Clinical Liver Disease*, 2003: p. 261–287.
  22. Michael G. Katze, Y.H.M.G., *Viruses and interferon: a fight for supremacy*. *Nature Reviews Immunology* 2002. **2**: p. 675-687.
  23. Jordan J. Feld, J.H.H., *Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C*. *Nature* 2005. **436**: p. 967-972.
  24. Parfieniuk A, J.J., Flisiak R. , *Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus*. . *World J Gastroenterol* 2007. **13**: p. 5673-81.
  25. McHutchison JG, L.E., Shiffman ML, et al; , *Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection*. *N Engl J Med* 2009. **361**: p. 580-93.
  26. Cooper, C.L., *Viral response to specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C and the implications for treatment success*. *Can J Gastroenterol* 2010. **24**.
  27. Cooper C, e.a., *Safety, tolerability and pharmacokinetics of the HCV polymerase inhibitor VCH-222 following single dose administration in healthy volunteers and antiviral activity in HCV-infected individuals*. . The 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, 2009.
  28. Cooper C, L.E., Ghali P, et al. , *Evaluation of VCH-759 monotherapy in hepatitis C infection*. . *J Hepatol*, 2009. **51**: p. 39-46.
  29. Hammond J, e.a.A.a.o.t.H.p.i.P.-a.a.m.i.H.g.i.s., The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2008.
  30. Teresa Rampino, E.A., Marilena Gregorini, Paola Guallini, Carmelo Libetta, Milena Maggio, Andrea Ranghino, Enrico Silini, Grazia Soccio, Antonio dal Canton, *Hemodialysis prevents liver disease caused by hepatitis C virus: Role of hepatocyte growth factor*. *Kidney International*, 1999 **56**: p. 2286-2291.
  31. Qui-LIM CHOO, G.K., AMY J. WEINER, LACY R. OVERBY, DANIEL W. BRADLEY, MICHAEL HOUGHTON, *Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome* *SCIENCE*, 1989. **244** p. 359-361.
  32. *Management of Hepatitis C. NIH Consensus and State-of-the-Science Statements*. 2002. **19**.
  33. WHO/CDS/CSR/LYO, *Hepatitis C The entire guide*. *World Health Organization*. 2002
  34. M Rice, e.a., *Studying Hepatitis C Virus: Making the Best of a Bad Virus*. . *Journal of Virology* 2007.
  35. P. André, G.P., A. Budkowska, C. Bréchet, V. Lotteau *Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism*. *Semin. Liver Dis.*, 2005. **25**: p. 93–104.
  36. M. J. Evans, e.a., *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. . *Nature*, 2007: p. 801–805.
  37. B. Bartosch, F.L.C., *Cell entry of hepatitis C virus*. *Virology* 2006. **348**: p. 1–12
  38. L. Cocquerel, C.V., J. Dubuisson. , *Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions*. *J. Gen. Virol.*, 2006. **87**: p. 1075–1084
  39. Proctor, P.H., *Free Radicals and Human Disease*. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, 1989. **1**: p. 209-221.
  40. Marcia Avello, M.S., *Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular*.
  41. Jinah Choi, J.H.J.O., *Mechanisms of Liver Injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **290**: p. G847–G851.
  42. K. Swietek, J.J., *Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis*. *Journal of Hepatology*, 1997. **4**: p. 139-141.
  43. G WARIS, A.S., *Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C*. *Journal of Biosciences*, 2003. **28**: p. 311-321.

44. Michael A. Joyce, K.-A.W., Sue-Ellen Lamb, Mathew M. Yeh, Lin-Fu Zhu, Norman Kneteman, Jason S. Doyle, Michael G. Katze, D. Lorne Tyrrell, *HCV Induces Oxidative and ER Stress, and Sensitizes Infected Cells to Apoptosis in SCID/Alb-uPA Mice*. PLOS Pathogens, 2009. **5**.
45. Guozhong Gong, G.W., Rasheeda Tanveer, Aleem Siddiqui, *Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kB*. PNAS, 2001. **98**: p. 9599–9604.
46. Sophie Clément, S.P., Francesco Negro, *Hepatitis C Virus Infection: Molecular Pathways to Steatosis, Insulin Resistance and Oxidative Stress*. Viruses 2009. **1**: p. 126-143.
47. Scott K. Powers, S.L.L., *Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle*. Proceedings of the Nutrition Society, 1999. **58**: p. 1025–1033.
48. Karina Trujillo Murillo, A.R.R.S., Herminia Martínez Rodríguez, Francisco Bosques Padilla, Javier Ramos Jiménez, Hugo A. Barrera Saldaña, Marcos Rojkind, Ana María Rivas Estilla, *Acetylsalicylic acid inhibits hepatitis C virus RNA and protein expression through cyclooxygenase 2 signaling pathways*. Journal of Hepatology, 2008: p. 1462-1472.
49. V. Lohmann, F.K., J.O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, R. Bartenschlager, *Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line*. Science, 1999. **285**: p. 110-113.
50. Keith D. Tardif, K.M., Aleem Siddiqui, *Hepatitis C Virus Subgenomic Replicons Induce Endoplasmic Reticulum Stress Activating an Intracellular Signaling Pathway*. Journal of Virology, 2002. **76**: p. 7453–7459.
51. Stuart KA, R.S., Lidder S, Crostella L, Williams R, Skouteris GG., *Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling*. Int J Exp Pathol., 2000. **81**: p. 17-30.
52. F Xue, T.T., Y Yata, Y Kuwabara, E Shinno, K Nonome, M Minemura, S Takahara, X Li, E Yamato, A Watanabe, *Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy*. Gut, 2003. **52**: p. 694-700.
53. Funakoshi H, N.T., *Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications*. Clin Chim Acta. , 2003. **327**: p. 1-23.
54. G.K. Michalopoulos, R.Z., *Hepatocyte growth factor (editorial)*. Hepatology 1992. **15**: p. 149-155.
55. G.K. Michalopoulos, K.A.H., M.L. Dolan, N.C. Luetke., *Control of hepatocyte replication by two serum factors*. . Cancer Res, 1984. **44**(4414-4419).
56. E. Gohda, H.T., H. Nakayama, S. Hirono, O. Sakiyama, K. Takahashi, H. Miyazaki, S. Hashimoto, Y. Daikuhara. , *Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure*. J Clin Invest, 1998. **81**: p. 414-419.
57. T. Nakamura, H.T., A. Ichihara. , *Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures*. Proc Natl Acad Sci 1986. **83**: p. 6489-6493.
58. Ishiki Y, O.H., Muto Y, Matsumoto K, Nakamura T. , *Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and has a potent antihepatitis effect in vivo*. . Hepatology 1992. **16**: p. 1227-1235.
59. Shiota G, W.T., Nakamura T, Schmidt EV. , *Hepatocyte growth factor in transgenic mice: Effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression*. . Hepatology 1994. **19**: p. 962-972.
60. Naldini L, V.E., Narsimhan RP, Gandino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM. , *Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the protooncogene c-met*. Oncogene, 1991. **6**: p. 501-504.
61. Bottaro DP, R.J., Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. , *Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met protooncogene product*. Science 1991. **251**: p. 802-804.
62. Kunio Matsumoto, T.N., *Renotropic role and therapeutic potential of HGF in the kidney*. Nephrol Dial Transplant 2002. **17**: p. 59–61.
63. NCBI, *HGF hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor) [ Homo sapiens ]*. Gene ID: 3082.
64. Yoshida CM, G.J., *Hepatocyte growth factor stimulates the phosphorylation of multiple proteins in primary cultures of rat hepatocytes*. Hepatology, 1992.

65. Adachi T, N.S., Saji S, Nakamura T, Nozawa Y. , *Roles of prostaglandin production and mitogen-activated protein kinase activation in hepatocyte growth factor-mediated rat hepatocyte proliferation.* . Hepatology, 1995. **21**: p. 1668-1674.
66. Pelicci G, G.S., Zhen Z, Salcini AE, Lanfrancone L, Bardelli A, Panayotou G, Waterfield MD, Ponzetto C, Pelicci PG, et al., *The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein.* Oncogene. 1995. **10**: p. 1631-8.
67. P C Ma, M.S.T., V Nallasura, R Jagadeeswaran, A N Husain, R Salgia, *Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion.* British Journal of Cancer.
68. Gustavo A Vargas, A.H., Peter M Jehle, *Hepatocyte growth factor in renal failure: Promise and reality.* Kidney International, 2000. **57**: p. 1426–1436.
69. Tsuboi, S., *Elevation of Glutathione Level in Rat Hepatocytes by Hepatocyte Growth Factor via Induction of 7-Glutamylcysteine Synthetase.* J. Biochem., 1999. **126**: p. 815-820
70. Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J. Biochem. Pharmacol., 2006. **72**: p. 1493–1505.
71. Kyung Hee Lee, J.-R.K., *Reactive oxygen species regulate the generation of urokinase plasminogen activator in human hepatoma cells via MAPK pathways after treatment with hepatocyte growth factor.* . Experimental and Molecular Medicine., 2009 **41**: p. 180-188.
72. Gómez-Quiroz, e.a., *Hepatocyte-specific c-Met Deletion Disrupts Redox Homeostasis and Sensitizes to Fas- mediated Apoptosis.* . The Journal of Biological Chemistry. , 2008
73. Jacek Borawski, M.D., Krystyna Pawlak, Ph. D., Beata Naumnik, M.D., and Michal Mysliwiec, M.D., *Relations between oxidative stress, hepatocyte growth factor, and liver disease in hemodialysis patients.* Renal Failure, 2002. **24**: p. 825-837.
74. Barril G, e.a., *Effect of Hemodialysis schedules and membranes on hepatocyte growth factor and hepatitis C virus RNA levels.* . Journal of Medical Virology., 2010.
75. Al-Nasiry, S.e.a., *The use of alamarBlue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells.* . Hum Reprod, 2007. **22**: p. 1304–1309.
76. Hamid, R.e.a., *Comparison of alamarBlue and MTT assays for high through-put screening.* Toxicol In Vitro, 2004. **18**: p. 703–10.
77. Sola R, C.d.C.E., Hombrados M, Planas R, Coll S, Jardi R, et al. , *Prevalence of hepatitis B and hepatitis C viruses in different counties of Catalonia, Spain: cross-sectional study.* . Med Clin 90-5., 2002. **119**: p. 90-5.
78. Seeff, L.B., *Natural History of Chronic Hepatitis C.* Hepatology, 2002. **36**.
79. Vijayan A, M.D., Sadow JL, Kissane J, Miller SB. , *Hepatocyte growth factor inhibits apoptosis after ischemic renal injury in rats.* . Am J Kidney Dis 2001. **38**: p. 274-278.
80. Mizuno M, H.T., Yanai M, Kanmatsuse K, Esumi M. . and . *Dialysis-membrane-dependent reduction and adsorption of circulating hepatitis C virus during hemodialysis.* Nephron, 2002. **2**: p. 235–242.
81. Fabrizi F, B.S., Lunghi G, Martin P. , *Kinetics of hepatitis C virus load during hemodialysis: Novel perspectives.* J Nephrol 2003. **4**: p. 467–475.
82. Badalamenti S, C.A., Lunghi G, Covini G, Bredi E, Brancaccio D, Salvadori M, Como G, Ponticelli C, Graziani G. , *Changes in viremia and circulating interferon-alpha during hemodialysis in hepatitis C virus-positive patients: Only coincidental phenomena?* Am J Kidney Dis, 2003. **42**: p. 143–150.
83. Lee HS, H.A., Huang GT, Yang PM, Chen PJ, Sheu JC, Lai MY, Lee SC, Chou CK, Chen DS., *Hepatocyte growth factor stimulates the growth and activates mitogen-activated protein kinase in human hepatoma cells.* J Biomed Sci., 1998. **5**: p. 180-4.
84. Shiota G, W.T., Nakamura T, Schmidt EV., *Hepatocyte growth factor in transgenic mice: Effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression.* . Hepatology, 1994. **19**: p. 962-972.
85. Shiota G, R.D., Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV. , *Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells.* Proc Natl Acad Sci 1992. **89**: p. 373-377.
86. Reshma Shringarpure, T.G., Jana Mehlhase, Kelvin J. A. Davies, *Ubiquitin Conjugation Is Not Required for the Degradation of Oxidized Proteins by Proteasome.* The Journal of Biological Chemistry., 2003. **278**: p. 311–318.
87. TILMAN GRUNE, T.R., AND KELVIN J. A. DAVIES, *Degradation of oxidized proteins in mammalian cells.* FASEB Journal, 1997. **11**: p. 526-534.

## XI. ANEXOS

### Protocolos Generales y Preparación de Reactivos

#### Protocolos

##### 1. Congelación de células

1. Retirar el medio de una botella de 75 cm<sup>2</sup> con confluencia de 90%, la cual contiene aproximadamente entre 5 y 7 millones de células.
2. Lavar con PBS 1x.
3. Tripsinizar con 3 mL de tripsina (0.25%, 1x, GIBCO, Invitrogen, EUA) por 5-7 min a 37°C. Transcurrido el tiempo, se debe verificar que las células se han despegado macro o microscópicamente.
4. Inactivar con un volumen igual de medio con suero (3 mL).
5. Transferir las células a un tubo Falcon de 15 mL, centrifugar por 5 min a 1000 rpm para formar un botón. Retirar el sobrenadante de medio de cultivo y tripsina inactivada.
6. Resuspender en el volumen adecuado de SBF (900 µL por cada vial a preparar).
7. Depositar en cada vial 100 µL de DMSO y 900 µL de células resuspendidas en SBF. Agitar suavemente, flamear, sellar con parafilm y rotular.
8. Dejar reposar en hielo por 5 min, luego 2 h a -20°C y almacenar a -80°C hasta su uso.

#### Observaciones:

- \* Cada mL de mezcla para congelar debe contener 1-2 millones de células.
- \* Para congelar puede usarse medio de cultivo con un alto porcentaje de SBF, pero se obtienen mejores resultados en la preservación al congelar sólo en SBF con un 10% de DMSO.
- \* De la temperatura de -80°C, las células pueden transferirse a un contenedor de nitrógeno líquido para extender su vida útil.

## **2. Descongelación de células**

1. Preparar un baño de agua a 37°C.
2. Retirar los crioviales del congelador de -80°C y sumergirlos, a modo de cubrir casi todo el vial, en el agua a 37°C.
3. Limpiar rápidamente los viales con etanol antes de introducirlos en la campana de flujo laminar.
4. Transferir el contenido del vial descongelado, lenta y cuidadosamente, en botellas de 25 cm<sup>2</sup> acondicionadas previamente con 5 mL de medio ADMEM.
5. Observar 12-24 h después en el microscopio para verificar la adhesión celular. Si se necesita, puede hacerse un lavado con 3 mL de PBS y adicionar medio fresco para eliminar células muertas y detrito celular.

### **Observaciones:**

\* Una vez que se inicia el atemperamiento no se puede congelar de nuevo las células.

## **3. Cultivo y subcultivo de la línea celular Huh-7 Parental y Huh-7 Replicón**

1. Revisar las células al microscopio en 10x y 40x para corroborar que se encuentren a un 90-95% de confluencia.
2. Retirar el medio por aspiración.
3. Lavar con PBS 1x, botellas de 75 cm<sup>2</sup> con 5 mL y de 25 cm<sup>2</sup> con 3 mL. Retirar el buffer por aspiración.
4. Adicionar tripsina (botellas de 75 cm<sup>2</sup> con 3 mL y de 25 cm<sup>2</sup> con 2 mL), incubar a 37°C por 5-7 min.
5. Neutralizar usando medio de cultivo con suero en proporción 1:1 respecto a la tripsina, agitando suavemente de un lado a otro para mezclar.
6. Colocar el contenido de un tubo Falcon de 15 mL para centrifugar 5 min a 1000 rpm y formar una pastilla.

7. Remover el medio y la tripsina inactivada con puntilla estéril o pipeta estéril, evitando tocar el botón de células. Resuspender en el volumen apropiado de medio nuevo, 2 mL por cada botella de 75 cm<sup>2</sup>.
8. Tomar la alícuota correspondiente de la resuspensión celular según la cantidad de células a conservar.
9. Depositar en botellas nuevas o reusadas acondicionadas con medio nuevo suplementado y geneticina en el caso de las células Replicón.

**Observaciones:**

- \* La tripsina no debe dejarse por más de 10 min.
- \* A botellas de 75 cm<sup>2</sup> se les adicionan 10 mL de medio. Para botellas de 25 cm<sup>2</sup> es suficiente con 5 mL.
- \* Deben adicionarse 5 µL de geneticina (100 mg/mL) por cada mL de medio de cultivo.
- \* Las botellas pueden reutilizarse para subcultivos, previo lavado con PBS 1x para eliminar residuos.

**4. Conteo y viabilidad celular con azul de tripano**

1. Retirar el medio de cultivo de la botella por aspiración y lavar con 3-4 mL de PBS 1x.
2. Tripsinizar con 3 mL de tripsina por 5 min a 37°C e inactivar con un volumen igual de medio con suero.
3. Depositar en un tubo falcon de 15 mL y centrifugar a 1000 rpm por 5 min.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender en 3 mL, o el volumen adecuado según el tamaño del botón celular, de medio nuevo.
5. Preparar en un tubo eppendorf de 0.3 mL una mezcla de 60 µL de medio, 10 µL de azul de tripano y 10 µL de las células resuspendidas a modo de tener una dilución 1:8. Los volúmenes pueden ajustarse según las necesidades particulares tomando nota de la dilución.

6. Contar en la cámara de Neubauer en los 4 cuadros grandes, en el cuadro del centro o en ambos para corroborar el cálculo. El número de células por mL se estima según las siguientes fórmulas:

$$\text{Células/mL} = (\text{Promedio de células contadas en los 4 cuadros grandes})(8)(1 \times 10^4)$$

$$\text{Células/mL} = (\text{Células contadas en cuadro central})(8)(1 \times 10^4)$$

7. Tomar el volumen que contenga las células deseadas. Subcultivar, sembrar en placa o desechar el resto.

**Observaciones:**

\* En el cálculo de conteo usando los 4 cuadros grandes de la cámara, se multiplica por 8 porque la dilución es 1:8, pero puede diluirse más o menos según convenga.

\* Una vez hecha la mezcla con el colorante azul de tripano, el conteo debe realizarse inmediatamente para tener un dato confiable de las células vivas y muertas.

**5. Siembra en placas de cultivo**

1. Con las células contadas (células/mL), se toma el volumen que contenga el número de células deseadas y se mezcla con el volumen total de medio de cultivo para sembrar las placas correspondientes.
2. Mezclar suavemente por agitación y observar al microscopio.
3. Incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> el tiempo establecido de acuerdo al experimento a realizar.

**Observaciones:**

\* La adhesión de las células debe permitirse en un tiempo de 12-16 h. Luego, se realiza el cambio de medio a medio sin suero, para dejar incubando al menos 6 horas. Posteriormente se inicia el tratamiento adicionando la cantidad establecida de HGF directo sobre la placa.

## **6. Tratamiento con HGF**

La solución de trabajo de HGF se realizó a partir de un vial conteniendo 10µg de HGF liofilizado el cual fue disuelto en 1 mL de agua Mili-Q estéril, para terminar en una concentración de 10 µg/mL. La cual fue almacenada a -20°C hasta su uso.

## **7. Extracción de RNA total**

### **Fase de homogenización**

1. Adicionar 200 uL de reactivo trizol a la placa, en este caso de 6 pozos) después de haber quitado el medio de cultivo. Mezclar y pasar el contenido a un tubo eppendorf de 1.5 mL.

### **Fase de separación**

2. Incubar 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
3. Añadir 40 uL de cloroformo por cada 200 uL de trizol y mezclar por inversión 15 s.
4. Incubar el tubo en hielo 3 min.
5. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 min a 4°C.

### **Precipitación del RNA**

6. Recuperar la fase acuosa y adicionarle 100 uL de isopropanol e incubar a -80°C por 1 hora o toda la noche.
7. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 min a 4°C.

### **Lavado**

8. Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 200 uL de etanol al 70 % (preparado con agua DEPC). Mezclar con vórtex.
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C.
10. Retirar el etanol cuidadosamente con la pipeta.
11. Resuspender en 12 uL de agua DEPC y 0.3 uL de RNAsas out.
12. Almacenar a -80°C.

## **8. Retrotranscripción (RT-PCR)**

1. Cada una de las muestras de RNA se descongelan cuidadosamente en hielo y de preferencia una sola vez, para disminuir la degradación del RNA.
2. Marcar un microtubo para PCR con la leyenda Mix 1 y otro con Mix 2.
3. Al microtubos marcado con Mix 1, se le agregan los siguientes componentes:
  - a. 5,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC
  - b. 1  $\mu$ L de Random Primers
  - c. 5  $\mu$ L del RNA extraído en el procedimiento anterior.
4. Incubar el Mix 1 a 72°C durante 10 minutos en el termociclador.
5. Durante la incubación del Mix 1, se procede a preparar el Mix 2, al cual se le agregan los siguientes componentes:
  - a. 4 $\mu$ L de Buffer RT 5x.
  - b. 2  $\mu$ L de DTT 0,1 M
  - c. 0,5 $\mu$ L de RNasa-Out 40 U/ $\mu$ L
  - d. 1  $\mu$ L de dNTP's
  - e. 1 $\mu$ L de M-MLV 200 U/ $\mu$ L
6. Luego de terminar la incubación, el tubo rotulado como Mix 1 se coloca en hielo durante 3 minutos.
7. Pasado este tiempo, se toman los 8,5  $\mu$ L del tubo rotulado como Mix 2 y se mezclan con el contenido del Mix 1.
8. La mezcla de los dos Mix se coloca en el termociclador para continuar con el siguiente orden de temperaturas:
  - a. 10 minutos a 25°C
  - b. 1 hora a 37°C
  - c. 5 minutos a 94°C
  - d. 30 minutos a 4°C
9. Una vez terminado, se almacenan a -20°C hasta su uso.

## 9. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

Posteriormente se realiza la PCR en tiempo real siguiendo las siguientes indicaciones:

1. Realizar un mix para todas las muestras a analizar conteniendo la sonda taqman y el master mix.
2. Añadir a cada tubo 11  $\mu\text{L}$  de la mezcla (10 Master mix y 1 de sonda).
3. Añadir la cantidad de cDNA estipulada.
4. Completar con agua DEPC a la cantidad de 20 $\mu\text{L}$ .
5. Tapar cuidadosamente los tubos sin tocar la parte superior de la tapa y usando toallas libres de polvo.
6. Colocar los tubos en el equipo y especificar el protocolo de reacción en reacción estándar, cuantificación relativa  $\Delta\Delta\text{Ct}$  y uso de sonda taqman.
7. En las tablas se presenta los reactivos en la reacción y las condiciones de ciclos de la PCR.

Reactivo	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
Master Mix	10
Agua DEPC	6.5
Sonda	1
Cdna	2.5

Componentes de la reacción

<b>Paso 1</b>	<b>50°C - 2'</b>
<b>Paso 2</b>	<b>95°C - 10'</b>
<b>Paso 3</b>	<b>95°C - 15"</b>
<b>Paso 4</b>	<b>60°C - 1'</b>
<b>Paso 5</b>	<b>Repetir 45 veces paso 3 y 4</b>

Ciclos de PCR

## **10. Extracción de proteínas.**

1. Eliminar el medio de la placa con pipeta y puntilla desechable.
2. Agregar 1 mL de PBS frío para humedecer la superficie.
3. Raspar con scraper o raspador plástico estéril el contorno de la mitad de la caja y el centro en un solo sentido, girando la placa en sentido de las manecillas de reloj, a modo de coleccionar las células en todas las posiciones.
4. Transferir el líquido a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
5. Añadir 500  $\mu$ L más de PBS 1x a la placa, raspar de nuevo y transferir al eppendorf. Depositar en hielo.
6. Dar una centrifugación rápida y retirar el sobrenadante. Repetir la centrifugación rápida y eliminar el remanente de líquido.
7. Adicionar un volumen 1:1 de buffer de lisis con respecto al pellet obtenido, aproximadamente 20  $\mu$ L para el tiempo de 0 horas y aumentar de 1-5  $\mu$ L por cada día transcurrido.
8. Incubar en hielo por 20 min.
9. Centrifugar 5 min, a 13,000 rpm a 4°C.
10. Retirar el sobrenadante (proteína) y pasarlo a un tubo nuevo.
11. Almacenar a -80°C hasta su uso.

### **Observaciones:**

\* El PBS 1x se necesita frío (4°C) para preservar de mejor manera las células hasta la extracción de proteínas.

\* Es importante eliminar la mayor cantidad de sobrenadante de medio y dejar la menor cantidad posible de líquido sin perturbar la pastilla celular debido que un exceso de líquido podría diluir la proteína a extraer.

En cada ronda de experimentos se usaron células Huh-7 parental y replicón del mismo pasaje; se trabajó con células con número de pasaje interno 20 hasta 30.

## 11. Curva estándar de referencia de proteínas

1. Preparar una solución stock de BSA a una concentración de 100 mg/mL, se recomienda un volumen final de 1 mL.
2. Diluir esta solución inicial 100 veces para obtener una segunda de 1 000  $\mu\text{g/mL}$ .
3. Diluir la solución de 1 000  $\mu\text{g/mL}$  10 veces más para preparar una solución de 100  $\mu\text{g/mL}$ , con la cual se prepararán los 5 estándares de la curva.
4. En la siguiente tabla se muestra las cantidades de los diferentes reactivos a mezclar para la preparación de los estándares directamente en la microplaca, con un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , usando la solución stock de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Estándar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Reactivo de Bradford	Sol. Stock de proteína	Agua miliQ
0	40 $\mu\text{L}$	--	160 $\mu\text{L}$
1	40 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	158 $\mu\text{L}$
5	40 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$
10	40 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	140 $\mu\text{L}$
15	40 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	130 $\mu\text{L}$
20	40 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$

5. Mezclar, dejar reposar por 5 min y leer a 600 nm de longitud de onda.
6. Con las absorbancia, construir la curva de calibración y calcular la ecuación de la recta con la que se hará la estimación de la cantidad de proteína.

### Observaciones:

\* Para las soluciones stock, el volumen de preparación recomendado es de 1 mL.

\* La evaluación de los estándares debe hacerse por triplicado, es recomendable que el coeficiente de variación sea menor al 5% y el coeficiente de correlación de la curva de, al menos, 0.980.

## **12. Cuantificación por el método de Bradford**

1. Preparar en una microplaca de 96 pozos lo siguiente:

Blanco        160  $\mu$ L de agua miliQ + 40  $\mu$ L de reactivo de Bradford

Muestra       159  $\mu$ L de agua miliQ + 40  $\mu$ L de reactivo de Bradford + 1  
 $\mu$ L de extracto de proteína sin diluir o diluido 1:3 o 1:5

2. Dejar reposar la reacción, luego de mezclar bien, por 5 min.

3. Leer en el lector de ELISA a 600 nm, seleccionando la opción #12 (Alamar 600).

4. Estimar la concentración haciendo el cálculo correspondiente con la ecuación de la recta previamente obtenida de la curva estándar de referencia.

### **Observaciones:**

\* Este método en microplaca permite que la reacción se realice con un volumen mínimo de muestra.

\* Una vez preparada la reacción es estable por 1 hr.

### **13. SDS-PAGE**

1. Preparar un gel de poliacrilamida de 7x10 cm con el gel separador a una concentración de 10% y el concentrador al 5%. Dejar polimerizar.
2. Tomar 20(Oxiblot) o 40(Western blot)  $\mu\text{g}$  de proteína y mezclar con buffer de desnaturalización en una proporción 1:4. La mezcla puede ajustarse para tener un volumen manejable de 10-12  $\mu\text{L}$ , aunque puede cargarse menos, 2-3  $\mu\text{L}$ .
3. Desnaturalizar las proteínas calentado a 94°C por 5 min en thermomixer y poner en hielo.
4. Armar la cámara, poner buffer de corrida 1x y cargar las muestras, incluyendo el marcador de peso molecular.
5. Correr a 80 V por aproximadamente 2 h.
6. Desmontar el gel y seguir a la transferencia.

### **14. Transferencia a la membrana de PVDF.**

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

## **15. Western Blot o inmunodetección**

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

## **16. Quimioluminiscencia**

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

### **17. Eliminación de anticuerpos (Stripping out)**

1. Sumergir la membrana PVDF en el buffer stripping 1X
2. Incubar la membrana a 50 °C durante 30 min por agitación.
3. Lavar la membrana 4 veces con TBS-T 1X o las veces que sean necesarias para eliminar el  $\beta$ -mercaptoetanol presente en el buffer.
4. Bloquear la membrana en buffer de bloqueo con leche durante 30 min.
5. Repetir el procedimiento de inmunodetección.

### **18. Oxiblot**

1. Realizar la extracción de proteínas como se describió anteriormente.
2. Utilizar de 15 a 20  $\mu$ g de proteína para la reacción de derivatización.
3. Desnaturalizar con un volumen equivalente de SDS 12% (1:1) para una concentración final de 6%.
4. Derivatizar la muestra añadiendo 10  $\mu$ L de DNPH 1x.
5. Incubar la reacción por 15 min. sin sobrepasar los 30 min.
6. Añadir 7.5  $\mu$ L de la solución neutralizadora.
7. Continuar con el procedimiento antes descrito para Western blot, utilizando los anticuerpos primario y secundario provistos en el kit de Oxiblot.

Observaciones:

- \* Utilizar una dilución de 1:150 para el anticuerpo primario y 1:300 para el anticuerpo secundario.

### **19. Determinación de ROS por DCFH**

1. Sembrar alrededor de 15 mil células en placas negras de 96 pozos.
2. Aplicar los tratamientos correspondientes
3. 30 min antes de cumplirse el tratamiento, añadir 2  $\mu\text{L}$  de DCFH 0.5 mM para obtener una concentración final en el pozo de 5  $\mu\text{M}$ .
4. Forrar la placa con aluminio e incubar los 30 min. a 37 °C.
5. Leer en un lector de fluorescencia para placas a una longitud de onda de excitación de 503 nm y de emisión de 529 nm.

## Preparación de Reactivos

### I. Cultivo Celular

#### 1. Medio de cultivo ADMEM (Invitrogen, Cat. 12491015)

Para 500 mL,

Suero 2%	10 mL
Glutamina 1%	5 mL
Aminoácidos no esenciales 1%	5 mL
Antibiótico 1%	5 mL

#### 2. Buffer PBS 1x

	Cantidad	Concentración final
NaCl	80 g	8%
KCl	2 g	0.20%
NaHPO <sub>4</sub>	14.4 g	1.44%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4 g	0.24%

Ajustar el pH a 7.4 con HCl y aforar a 1 L con agua destilada. Esterilizar y alicuotar.

#### 3. Geneticina

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

## II. Electroforesis

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

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

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

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

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

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

### 3. Buffer de corrida 5x

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

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

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

	Separador (10%)	Concentrador (5%)
Agua miliQ (mL)	4.02	3.05
Poliacrilamida al 30% (mL)	3.33	0.650
Buffer* (mL)	2.5	1.25
SDS 10% ( $\mu$ L)	0.1	0.050
PSA 10% ( $\mu$ L)	0.05	0.025
TEMED ( $\mu$ L)	0.01	0.010
	10.01 mL	8.085 mL

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

#### 5. Buffer de desnaturalización para proteínas

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

#### 6. SDS al 10% (ICN Biomedicals, Cat. 194831)

Pesar 10 g de SDS y aforar a 100 mL con agua destilada, agitar en placa para lograr la disolución. El reactivo es irritante por lo que se recomienda el uso de cubrebocas al pesarlo.

#### 7. Persulfato de amonio al 10% (Sigma, Cat. A9164)

Pesar 100 mg de reactivo sólido en tubos eppendorf y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegidos de la luz. Agregar 1 mL de agua destilada justo antes de usar.

## 18. Inhibidor de proteasas

Disolver 1 tableta de marca comercial en 1 mL de agua.

### III. Western blot

#### 1. Buffer de transferencia 10 X

Tris Base 25mM	60.6gr
Glicina 192mM	288gr
SDS 0.05%	10g
Agua DE	2000 ml

#### 2. TBS 10X

24.2 g Tris HCl + 80 g NaCl disolver en 900 mL de agua destilada.  
Ajustar pH a 7.6 y aforar a 1 L.

#### 3. TBS-T 1X

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

#### 4. Buffer de bloqueo con leche 1X

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

#### 5. Solución de Ponceau 0.1 %

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

Aforar a 200 mL con agua destilada

#### 6. Diluciones de anticuerpos

Los anticuerpos se diluyeron en 5 mL de TBS-T 1X según el anticuerpo utilizado fue la dilución que se usó.

#### 7. Buffer de stripping 1X

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl pH 6.7	31.25 g
SDS 10%	100 mL
B-mercaptoetanol	3.5 mL

Aforar a 500 mL con agua destilada.

### **IV. Ensayo de viabilidad con azul alamar**

Se utilizó azul alamar al 10 %. Directo del frasco se tomó la cantidad necesaria a utilizar y se diluyó con medio ADMEM, se prepara 1 día previo a su uso.

### **V. Determinación de ROS**

Para ello se utilizó la diclorofluoresceína diacetilada o DCFH al 0.5 mM se pesaron 0.00048 g, y se disolvieron en 2 mL de etanol grado reactivo.

Se preparó también peróxido de hidrógeno al 0.2 M a partir de una solución al 0.88 M. Se tomaron 227  $\mu$ L de la solución concentrada y se diluyeron con 773  $\mu$ L de agua Mili-Q estéril para obtener la concentración final de 0.2 M.