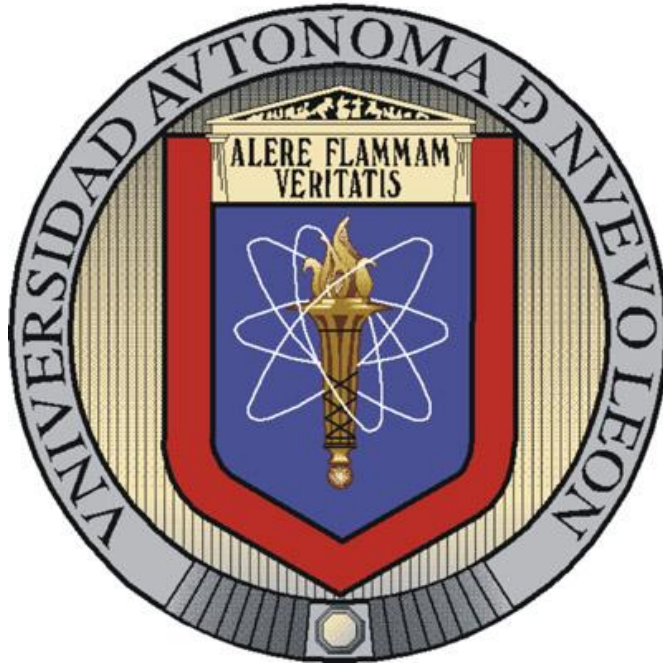


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y
NO-ESTRUCTURALES DEL VHC EN LA EXPRESIÓN DE COX-2**

Presenta:

QFB. TANYA BERNARDETTE SALAS VILLALOBOS

**Como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Monterrey, Nuevo León

Enero, 2013

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y
NO-ESTRUCTURALES DEL VHC EN LA EXPRESIÓN DE COX-2**

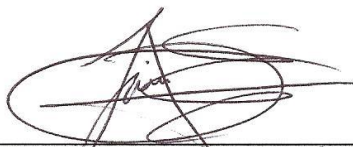
Aprobación de Tesis:



DRA. C. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA
Directora de Tesis



DRA. PhD. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA
Co-directora de Tesis



DR. C. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ
Comisión de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

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

ÍNDICE

ABREVIATURAS. FÓRMULAS Y SÍMBOLOS	V
LISTA DE TABLAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología de la Hepatitis C.....	1
1.2 Epidemiología de la Hepatitis C en México.....	2
1.2.1 Seroprevalencia de las hepatitis virales en México.....	2
1.2.2 Epidemiología del virus de la hepatitis C (VHC).....	3
1.3 Factores de Riesgo y vías de transmisión.....	5
1.4 Historia Natural de la Enfermedad.....	6
1.5 Virus de la Hepatitis C (VHC)	8
1.5.1 Clasificación y variabilidad genética	9
1.5.2 Genotipos VHC.....	10
1.5.3 Estructura Molecular de VHC.....	11
1.6 Ciclooxigenasa-2.....	17
1.6.1 Características moleculares y bioquímicas de COX-2	19
1.6.2 Localización intracelular de COX-2.....	22
1.7 COX-2 Y EL HÍGADO.....	23
1.7.1 Papel de la COX-2 en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas	23
1.7.2 Implicación de COX-2 en las hepatopatías crónicas.....	25
Capítulo II. ANTECEDENTES	29
Capítulo III. JUSTIFICACIÓN.....	30
Capítulo IV. OBJETIVOS.....	31
Capítulo V. MATERIALES	32
5.1 Reactivos	32
5.1.1 Reactivos de uso general	32
5.1.2 Cultivo celular	32
5.1.3 Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR)	32

5.1.4	Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot.....	33
5.2	Materiales.....	34
5.2.1	Material de uso general	34
5.2.2	Cultivo celular	34
5.2.3	PCR en tiempo real	35
5.2.4	Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot.....	35
5.2.5	Material Biológico.....	35
5.3	Equipos.....	36
5.3.1	Equipo de uso general	36
5.3.2	Cultivo celular	36
5.3.3	Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR)	36
5.3.4	Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western-Blot.....	36
CAPÍTULO VI.....		37
6.1	Preparación y transformación de células <i>E. coli</i> TOP 10 Ca-competentes	38
6.1.1	Preparación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl ₂	38
6.1.2	Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl ₂ (Cohen et al., 1972).....	38
6.2	Preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS: Midiprep.....	39
6.3	Caracterización de plásmidos, pFK1pNS5A y pE2	41
6.3.1	Caracterización del plásmido pFK1	41
6.3.2	Caracterización del plásmido pNS5A y pE2	41
6.3.3	Purificación del ADN plasmídico a partir de gel de agarosa al 1%.	41
6.4	Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante.....	41
6.5	Cultivo de células Hela	42
6.6	Ensayo de actividad biológica de <i>virus vaccinia</i>	42
6.7	Cultivo de células HuH-7	42
6.7.1	Stock de células HuH-7 Parental.....	42
6.7.2	Subcultivo de células HuH-7 Parental.....	43
6.8	Cultivo de células HepG2	44
6.8.1	Subcultivo de células HepG2	44
6.9	Ensayo de transfección transitoria.....	45

6.10	Extracción de ARN total a partir de células en monocapa por el método de TRIzol®.....	48
6.11	Retrotranscripción mediante M-MLV (RT-PCR M-MLV)	49
6.12	Cuantificación relativa del ARN viral por RT-PCR en Tiempo Real	51
6.12.1	Replicón completo pFK1 ₃₈₉ -NS3-3' y GAPDH	51
6.12.2	GEN NS5A; Gen E2	52
6.12.3	Gen COX-2	53
6.13	Extracción y cuantificación de proteínas totales	54
6.13.1	Extracción de proteínas totales.....	54
6.13.2	Cuantificación de proteínas por Método de Bradford	55
6.14	SDS-PAGE y electrotransferencia en condiciones húmedas	55
6.14.1	Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	55
6.14.2	Electrotransferencia en condiciones húmedas.....	56
6.15	Ensayo de Western blot.....	57
Capítulo VII. RESULTADOS.....		58
7.1	Preparación y transformación de células <i>E. coli</i> TOP 10 Ca-competentes	58
7.1.1	Preparación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl ₂	58
7.2	Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl ₂ (Cohen et al., 1972).....	58
7.3	Preparación de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS: Midiprep.....	59
7.4	Caracterización de plásmidos pFK1, pNS5A y pE2	60
7.4.1	Caracterización del plásmido pFK1	61
7.4.2	Caracterización del plásmido pNS5A y pE2	62
7.5	Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante.....	64
7.6	Ensayo de actividad biológica de <i>virus vaccinia</i>	66
7.7	Transfección transitoria de células HuH-7 con pFK1. Expresión de proteínas no- estructurales del VHC.	68
7.8	Transfección transitoria de células HepG2 con pFK1. Expresión de proteínas no- estructurales del VHC.	70
7.9	Transfección transitoria de células HuH-7 con pNS5A. Expresión de proteína no- estructural NS5A del VHC.....	71
7.10	Transfección transitoria de células HepG2 con pNS5A. Expresión de proteína no- estructural NS5A del VHC.....	73

7.11	Transfección transitoria de células HuH-7 con pE2. Expresión de proteína estructural E2 del VHC.	75
7.12	Transfección transitoria de células HepG2 con pE2. Expresión de proteína estructural E2 del VHC.	76
7.13	Transfección transitoria de células HuH-7 con pFK1pCOX-2.	80
7.14	Transfección transitoria de células HepG2 con pFK1pCOX-2.	83
7.15	Transfección transitoria de células HuH-7 con pNS5ApCOX-2.	86
7.16	Transfección transitoria de células HepG2 con pNS5ApCOX-2.	89
7.17	Transfección transitoria de células HuH-7 con pE2pCOX-2.	92
7.18	Transfección transitoria de células HepG2 con pE2pCOX-2.	94
CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN.....		97
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES		102
CAPÍTULO X. PERSPECTIVAS.....		103
CAPÍTULO XII. BIBLIOGRAFÍA		104
CAPÍTULO XIII. ANEXOS		110
CULTIVO CELULAR		110

ABREVIATURAS. FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
°C	Grados centígrados
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
COX	Ciclooxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
E2	proteína de envoltura E2 del VHC
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético.
Da	Daltones
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
h	Horas
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
g	Gramos
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
LB	Luria Bertani
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
M	Molar
μM	Micromolaridad
μg	Microgramos
μL	Microlitros
ng	Nanogramos
nM	Nanomolaridad
NS5A	Proteína no estructural 5A del VHC
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pCOX2	plásmido que codifica para ciclooxigenasa 2
pE2	plásmido que codifica para E2
pFK1	plásmido que codifica para las proteínas no estructurales del VHC
pNS5A	plásmido que codifica para NS5A
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	PCR cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
s	segundos
Taq	Thermophilus aquaticus
TE	Buffer Tris-EDTA
TCID	Dosis infecciosa para cultivo tisular
UV	Ultravioleta
V	Volts
VHC	Virus de la Hepatitis C
Wb	Western blot
SDS	Dodecil sulfato de sodio

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación genética del VHC

TABLA 2. Oligonucleótidos para amplificar gen NS5A de VHC genotipo 1b

TABLA 3. Oligonucleótidos para amplificar gen E2 de VHC genotipo 1b

TABLA 4. Cantidad de reactivos a utilizar. Experimento en cajas de 6 pozos para extracción de proteínas totales. (Ensayo de transfección, objetivo 2)

TABLA 5. Cantidad de reactivos a utilizar. Experimento en cajas de 6 pozos para extracción de proteínas totales a 36h (co-transfección. Objetivo 3).

TABLA 6. Cantidad de reactivos a utilizar. Experimento en cajas de 24 pozos para extracción de ARN total a 36h (co-transfección. Objetivo 3).

TABLA 7. Reactivos mezcla 1 para RT-PCR MMLV

TABLA 8. Reactivos mezcla 2 para RT-PCR MMLV

TABLA 9. Condiciones de RT-PCR

TABLA 10. Reactivos: Mix para qPCR .Amplificación: ARN de 5'UTR-NS5B (VHC) y ARN de GAPDH (Endógeno)

TABLA 11. Condiciones generales para Qpcr

TABLA 12. Reactivos para qPCR del gen NS5A y E2

TABLA 13. Reactivos para qPCR del gen COX-2

RESUMEN

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2

Nombre: Tanya Bernardette Salas Villalobos

Institución: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

Localización: Monterrey, Nuevo León

Fecha de titulación:

Páginas en el estudio:

Introducción: La Hepatitis C es causada por infección con el virus de la hepatitis C (VHC). En la actualidad no se conocen los mecanismos mediante los cuales el VHC modula la supervivencia celular. Se ha reportado un incremento en los niveles de ARNm de ciclooxigenasa-2 (COX-2) en células que expresan las proteínas virales, comparado con células que no tienen el replicón del VHC, sugiriendo que el VHC regula la transcripción de COX-2. Por lo que es importante elucidar la participación de COX-2 para determinar el mecanismo de acción por el cual las especies reactivas de oxígeno generadas por las proteínas virales activan la expresión de COX-2, la cual está relacionada con la supervivencia celular y tumoral.

Objetivo: Evaluar la participación de las proteínas virales estructural (E2) y no-estructural (NS5A) del Virus de la Hepatitis C en la regulación de la expresión de COX-2.

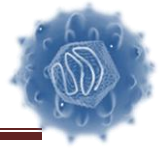
Materiales y Métodos: Se realizaron ensayos de sobreexpresión transitoria de las proteínas virales y se evaluó su efecto en dos líneas celulares de hepatocarcinoma (HuH-7 y HepG2). Se sembraron 200,000 células en placas de 6 pozos, posteriormente se realizó una primo-infección con *vaccinia virus* durante 1 hora antes de cada transfección. Los plásmidos pFK1, pNS5A y pE2 (0.5 µg y 1 µg) se transfectaron con lipofectamina y se extrajeron proteínas a los tiempos 0, 24, 36 y 48 h post-transfección. Posteriormente se realizó la cuantificación proteica por el método de Bradford y se realizó electroforesis en condiciones desnaturizantes, determinándose la expresión de COX-2 por Western blot. Por otra parte también se evaluó el efecto de las proteínas virales en la expresión de COX-2 a nivel de transcripción, para lo cual se les extrajo ARN total por el método de trizol y se cuantificó por PCR en tiempo real usando sondas Taqman específicas para una región de la secuencia de NS5A y Sybergreen con cebadores específicos para NS5A y E2, y normalizadas con β-Actina y GAPDH. Se seleccionó el tiempo 36h para los ensayos de co-transfección con el plásmido pCOX-2 (0.1 µg y 0.5 µg) con cada uno de los plásmidos pFK1, pNS5A y pE2 (0.2 µg y 0.5 µg) y se llevaron a cabo los ensayos de Western blot y Q-PCR como se describieron anteriormente.

Resultados: La regulación de COX-2 fue diferente en ambas líneas celulares. Sin embargo, se observó un incremento en la expresión de la proteína COX-2 en ambas líneas celulares transfectadas con pFK1, pNS5A y pE2 a las 36 h, por lo que se determinó el uso de este tiempo para los ensayos posteriores de Q-PCR y Western blot en la co-transfección de los plásmidos utilizados con pCOX-2. En el ensayo de cotransfección pFK1pCOX2 en las células HuH-7 se observó un incremento a nivel de transcripción de RNA-COX2 y RNA-VHC como a nivel de traducción proteína-COX-2 cuando se cotransfectaron 0.2 µg de pCOX-2, esto en presencia del RNA viral. En cambio, en la línea celular HepG2 la cotransfección de pFK1pCOX2 resultó en un nivel de expresión menor a nivel de proteína-COX-2; los niveles de RNA-VHC resultaron menores que en HuH-7 y RNA-COX2 fue mayor que en HuH-7. En el ensayo de cotransfección pNS5ApCOX2 en HuH-7 el incremento de RNA-COX2 y RNA-NS5A así como el nivel de proteína-COX-2 fue directamente proporcional de acuerdo a la cantidad de plásmido utilizada, no así en HepG2 en donde el nivel de proteína-COX-2 resultó en un nivel de expresión menor así como una disminución en el nivel de RNA-NS5A cuando se incrementó la cantidad de plásmido pCOX-2. En el ensayo de cotransfección pE2pCOX-2 en HuH-7 se observó una disminución del RNA-E2 en presencia de una sobreexpresión de COX-2, así como una disminución de la proteína-COX-2; a diferencia de lo encontrado en HepG2, en donde el nivel de RNA-E2 se incrementó en la cotransfección en comparación con el control de plásmido pE2, además el nivel de proteína-COX-2 fue mayor en comparación con HuH-7.

Conclusiones: La expresión de las proteínas virales en ambas líneas celulares HuH-7 y HepG2 resultó en un incremento en la expresión de la enzima COX-2, sugiriendo que la expresión de los genes del VHC regulan de manera diferencial la actividad de la transcripción de COX-2 en las 2 líneas celulares. El efecto de las proteínas NS del VHC en HuH-7 causó un incremento de la proteína COX-2 en comparación con HepG2. El efecto de NS5A del VHC en HuH-7 causó un incremento de la proteína COX-2 en comparación con HepG2. El efecto de E2 del VHC en HuH-7 causó una disminución de la proteína COX-2 en comparación con HepG2. Se demostró que cada una de las líneas celulares regula de manera diferencial las vías de señalización de COX-2 como respuesta a la presencia del VHC.

Dra. Ana María Rivas Estilla

Directora de Tesis



Capítulo I. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la Hepatitis C

La Hepatitis C (VHC) continúa siendo una enfermedad importante en el mundo. En 1999, la OMS estimó una prevalencia mundial de alrededor del 3% con el virus, que afecta a 170 millones de personas en todo el mundo. Por lo general, la mayoría de los estudios de prevalencia usan donadores de sangre para reportar la frecuencia del VHC generalmente con anticuerpos anti-VHC y no reportan las pruebas de seguimiento del VHC. Usando los donantes de sangre como una fuente prevalencia puede subestimar la prevalencia real del virus, ya que los donantes son generalmente una población altamente seleccionada. (Sy and Jamal 2006)

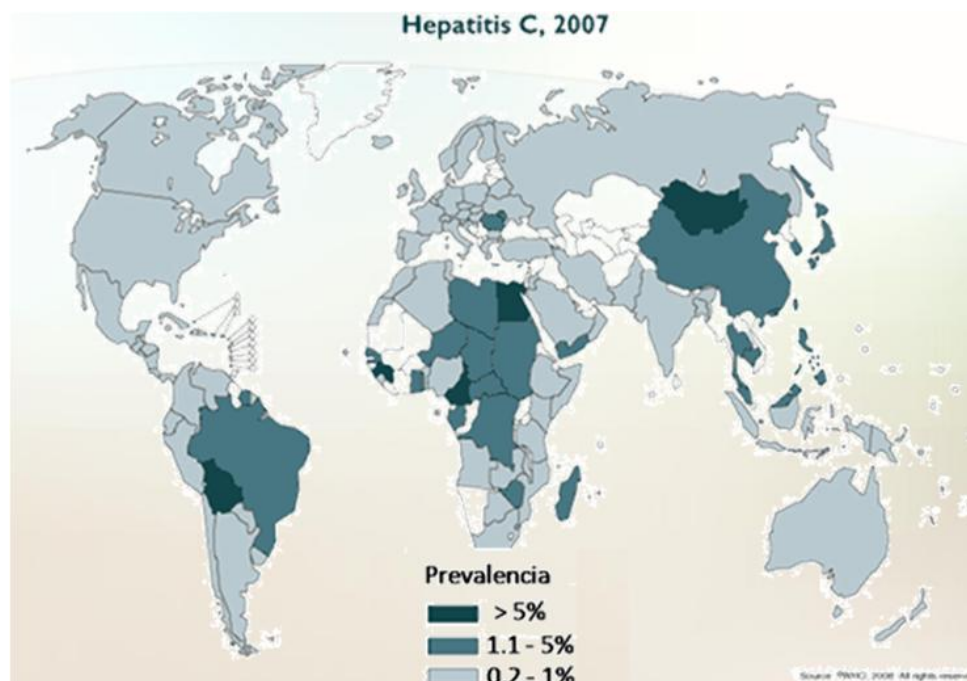
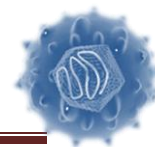


Fig.1 Distribución geográfica de la prevalencia de la Hepatitis C en el Mundo hasta el 2007. Se muestran los porcentajes de prevalencia por niveles alto (>5%), intermedio (1.1-5%) y bajo (0.2-1%). México se encuentra en un nivel bajo de prevalencia. (WHO, 2008).



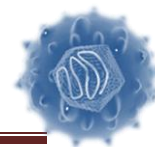
Entre América Central y del Sur, un reciente comunidad basada en estudio en San Juan, Puerto Rico, mostró que la prevalencia estimada del VHC en el período 2001-2002 fue del 6.3%. En México, la prevalencia fue aproximadamente 1.2%. Entre los donantes de sangre en Chile y Brasil, prevalencia de HCV Ab fue baja – 0.3%, 1.14% respectivamente. En Europa, la prevalencia general de HCV es de aproximadamente 1% pero varía entre los diferentes países.

1.2 Epidemiología de la Hepatitis C en México

1.2.1 Seroprevalencia de las hepatitis virales en México

A partir de 1990 se empieza a tener acceso a la información que reporta el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) de la Secretaría de Salud de México [Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS)]. De 1990-1999 se informa un total de 217 513 casos de hepatitis virales en el país, de los cuales 85.3% corresponden a VHA, 3.7% a VHB y 11.0% no cuentan con diagnóstico preciso. El VHC se empezó a informar desde el año 2000. Desde 2000 hasta 2007 se registra un total de 192 588 casos de hepatitis, de los cuales 79% corresponden a VHA, 3.3% a VHB, 6% a VHC y 11.7% a hepatitis sin agente etiológico conocido. Estas cifras muestran que en los últimos 20 años la hepatitis A ha disminuido modestamente en el país, no así el número de casos de VHB. De acuerdo con esta información el número de casos detectados de VHC es mayor que el de VHB. La infección por VHE no se registra por la Secretaría de Salud y se observa cerca de 12% de casos de hepatitis de etiología desconocida. Cuando la información reportada por el SUIVE se analiza por grupo de edad, se observa una distribución diferencial asociada a una determinada infección viral. De esta manera, la infección por el VHA se detecta principalmente en niños, mientras que el VHC se diagnostica en una mayor proporción en adultos entre 40 y 50 años. Asimismo, a pesar de la vacunación en recién nacidos contra el VHB a partir de 2000, se observa una ventana sin cobertura entre los adolescentes y adultos en edades sexualmente activas, que coincide con el incremento en la prevalencia del VHB en estos grupos de edad y que son susceptibles de infectarse. Las hepatitis sin diagnóstico y

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



clasificadas hasta la fecha como “otras” se detectan principalmente en niños y adolescentes y en menor proporción en adultos jóvenes (Panduro, Melendez et al. 2011).

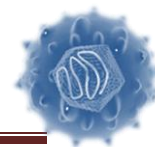
1.2.2 Epidemiología del virus de la hepatitis C (VHC)

El VHC es un virus de ARN para el que se han descrito 6 genotipos y más de 50 subtipos (Simmonds, Bukh et al. 2005).

Este virus representa la causa más común de hepatitis crónica y cirrosis hepática en el mundo (Panduro, Roman et al. 2010). A la fecha, no existe una vacuna que otorgue protección contra este virus, por lo que la comprensión de su dinámica es invaluable para el diseño de estrategias de prevención y tratamiento. En México, la principal vía de transmisión de VHC es la horizontal, a través del contacto con fluidos biológicos contaminados y/o material quirúrgico contaminado, al igual que el VHB. No obstante hay poca evidencia de su transmisión a través de las relaciones sexuales. La transmisión de este virus por vía intravenosa se ha descrito que ocurre en el norte del país en zonas de “picaderos” que frecuentan los adictos a drogas y en prisiones (Strathdee, Fraga et al. 2005).

Se han recabado evidencias suficientes para aseverar que la infección con este virus en México se debe a una iatrogenia médica, la cual parece iniciar en las décadas de los sesenta y setenta, cuando los bancos de sangre solían utilizar los servicios de los donadores de sangre profesionales (Volkow, Velasco et al. 2004). No obstante, su dispersión se da de una manera masiva a partir de la década de los setenta, cuando se generaliza el exceso en la realización de cirugías obstétricas, motivo por el cual la infección de este virus se presenta más en mujeres que en hombres. Se diagnostica principalmente cuando ya hay una manifestación clínica de cirrosis y el paciente no ha estado expuesto a otros factores etiológicos de cirrosis, como el alcoholismo. Se estima que en México hay de 400 000 a 1 400 000 personas infectadas (anti-VHC positivos) y de éstos 200 000 a 700 000 presentan viremia activa y requieren tratamiento antiviral (Chiquete and Panduro 2007).

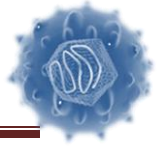
Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



La determinación de los genotipos del VHC en el país se inició desde 1998 (Panduro, Melendez et al. 2011). En México los genotipos de VHC que predominan son el 1a y el 1b y en una menor proporción el 2a y el 3b. Estudios filogenéticos de las primeras secuencias del genoma viral de cepas mexicanas sugieren que el virus llegó a México a través de donadores profesionales de sangre procedentes de Estados Unidos (Panduro, Roman et al. 2010).

Estudios de epidemiología molecular de este virus en México indican que los genotipos se distribuyen heterogéneamente en territorio nacional y que esto se debe a brotes específicos que surgen a partir de determinadas fuentes de contaminación. Por ejemplo en el Distrito Federal se han descrito prevalencias diferentes de genotipos en el norte y sur de la ciudad. Mientras que en un lado predomina el VHC genotipo 2b en el otro predominan el 1b y el 2a. Asimismo, se ha observado que el VHC genotipo 3a se detecta con mayor frecuencia en el norte y en el sur que en otras regiones del país, mientras que en el occidente predomina el genotipo 1a seguido del 1b desde hace más de 10 años (Panduro, Roman et al. 2010).

De una manera global el genotipo del VHC que predomina en México es el 1b y desafortunadamente pacientes que presentan este genotipo son más resistentes al tratamiento con interferón pegilado y ribavirina (Saludes, Bracho et al. 2010). Asimismo, el campo de la medicina genómica se ilustra con otro antecedente de pacientes infectados con VHC. Recientemente, se ha encontrado una relación entre respuestas limitadas al tratamiento combinado con IFN pegilado y ribavirina y sustituciones en los aminoácidos 70 y 91 del núcleo de la proteína del virus. Además, se ha caracterizado una correlación entre una variación genética en el locus de IL-28B y la respuesta al tratamiento (Chayama and Hayes 2011; Panduro, Melendez et al. 2011).



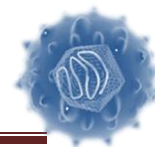
1.3 Factores de Riesgo y vías de transmisión

La prevalencia mundial de donadores de sangre es de 0.5 a 1.5 % y varía según la región geográfica. Estas diferencias dependen de costumbres regionales, uso de drogas intravenosas, tratamientos intravenosos que no controlan la presencia de VHC o por prácticas de medicina alternativa regional.

Las vías de transmisión pueden clasificarse como percutáneas y no-percutáneas. Dentro de la transmisión percutánea los factores relacionados con más firmeza a infección son la transfusión sanguínea y es el uso de drogas intravenosas. Otros mecanismos son por trasplante de órgano infectado, exposición ocupacional al punzarse con una aguja infectada, y los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) que están en tratamiento con hemodiálisis. La transmisión no percutánea está relacionada con transmisión sexual ó transmisión perinatal.

Desde la introducción de métodos de detección del virus que detectan anticuerpos contra este virus, el riesgo de transmisión por sangre donada ha disminuido de manera importante; el riesgo actual de transmisión del virus por una transfusión es menos de 1 por 100, 000 transfusiones.

El uso de drogas intravenosas es en la actualidad el modo de transmisión más frecuente, aunque en América Latina, en los casos identificados con hepatitis crónica, el principal facto de riesgo es hemotransfusión. Se han encontrado que los factores de riesgo más importantes fueron antecedentes de transfusión, uso de drogas intravenosas, uso de cocaína inhalada, promiscuidad sexual y el uso de aretes entre hombres (Muñoz-Espinosa, 2007; Hepatología).

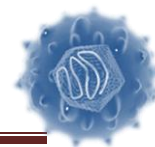


1.4 Historia Natural de la Enfermedad

La infección por hepatitis C aguda se diagnostica con poca frecuencia debido a que la mayoría de los individuos con infección aguda son asintomáticos. En transfusión sanguínea, donde la aparición de la infección aguda por VHC ha sido mejor documentado, entre el 70% - 80% de los casos fueron asintomáticos. Cerca de 20% a 30% de adultos con infección aguda por VHC pueden desarrollar síntomas clínicos. El inicio de sintomático se encuentra en el rango de 3 a 12 semanas después de la exposición. Los síntomas pueden incluir malestar general, debilidad, anorexia e ictericia. Los niveles de alanina aminotransferasa sérica (ALT), significa necrosis de hepatocitos, incrementándose de 2 a 8 semanas después de la exposición, y con frecuencia alcanzan niveles de más de 10 veces el límite superior de lo normal. ARN del VHC puede ser detectado en el suero de 1 a 2 semanas después de la exposición. El nivel de ARN de VHC se incrementa rápidamente durante las primeras semanas entre 10^5 a 10^7 UI / mL, poco antes de el pico de los niveles séricos de aminotransferasas y la aparición de los síntomas. (Alter 1997; Wasley and Alter 2000; Charlton 2001)

En la hepatitis C aguda autolimitada, los síntomas pueden durar varias semanas y desaparecer, así como la decadencia de los niveles de ALT y ARN-HCV. La infección aguda por el VHC puede ser grave, pero la insuficiencia hepática fulminante es rara. La hepatitis C crónica se caracteriza por la persistencia de ARN del VHC en la sangre durante al menos 6 meses después de la aparición de la infección aguda. El VHC es auto-limitante en sólo el 15% -25% de los pacientes en los que el ARN del VHC en el suero es indetectable y los niveles de ALT vuelven a la normalidad. Aproximadamente el 75% -85% de los pacientes infectados no eliminan el virus en 6 meses, y se desarrolla hepatitis crónica. La tasa de infección crónica por el VHC se ve afectada por muchos factores, incluyendo la edad en el momento de la infección, el género, la etnicidad y el desarrollo de ictericia durante la infección aguda. (Chen and Morgan 2006)

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



En el establecimiento de la persistencia de la viremia de hepatitis C, la tasa de progresión de la fibrosis hepática varía ampliamente. Se han realizado muchos estudios centrados en el curso natural de la progresión de la enfermedad de la hepatitis C crónica a cirrosis, carcinoma hepatocelular, y la muerte. La biopsia hepática es el estándar de oro para la clasificación de la hepatitis C crónica. La actividad de la enfermedad hepática o grado, se mide por el número de células mononucleares inflamatorias presentes en y alrededor del área portal, y por el número de hepatocitos muertos o moribundos. El daño hepático estructural, también conocido como fibrosis, es variable en la infección crónica por el VHC. La fibrosis implica la posible progresión a cirrosis. En los casos leves, la fibrosis se limita a las áreas de portal y periportal. Cambios más avanzados se define por la fibrosis que se extiende un área portal a otra, también conocido como "puentes de fibrosis". La Cirrosis se desarrolla en aproximadamente el 10% a 15% de los individuos con infección crónica por VHC. Hay factores externos y del huésped que puede incrementar el riesgo de progresión de la enfermedad hepática (ver Tabla 2). Múltiples estudios han demostrado que el uso crónico de alcohol es el principal factor de riesgo externo para la progresión de la hepatitis C crónica a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Factores de riesgo del huésped incluyen la edad avanzada en el momento de infección, sexo masculino, el grado de inflamación y la presencia de fibrosis en la biopsia hepática, la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o hepatitis B (VHB) y condiciones comórbidas como la inmunosupresión, la resistencia a la insulina, la esteatohepatitis no alcohólica, la hemocromatosis, y la esquistosomiasis (Chen and Morgan 2006).

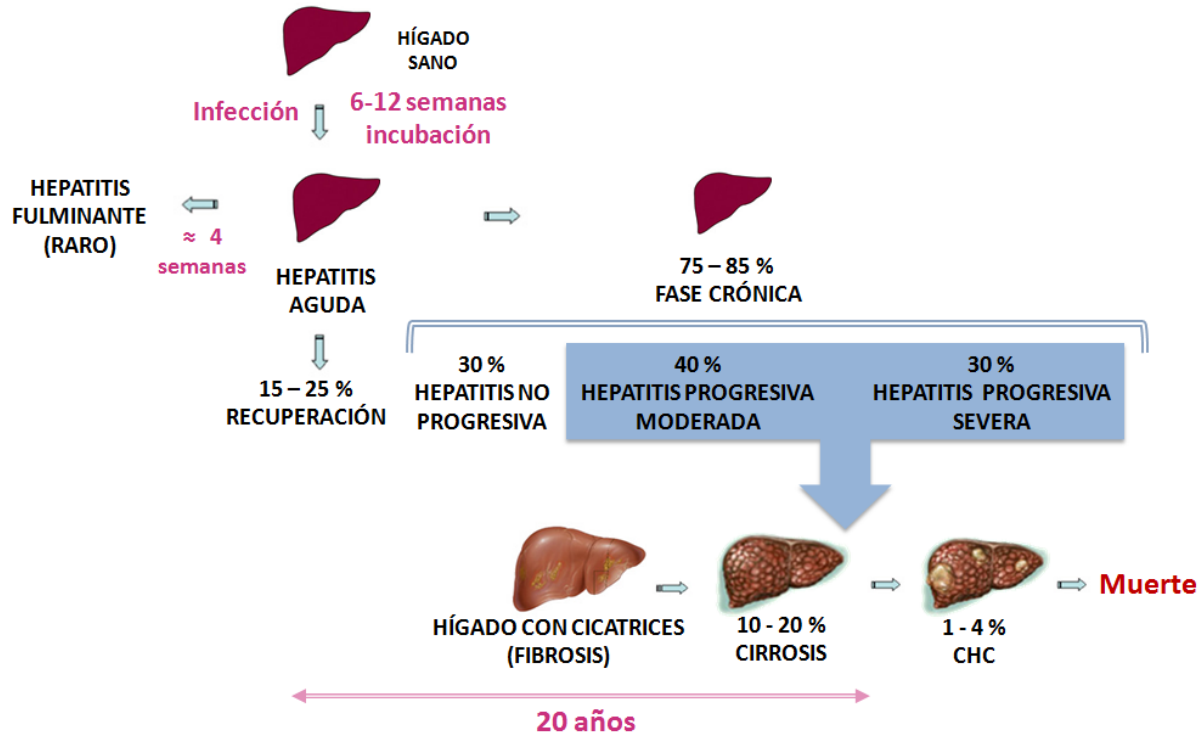
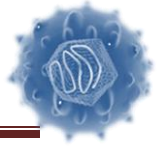
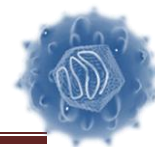


Fig 2. Historia Natural de la Enfermedad. Hepatitis C

1.5 Virus de la Hepatitis C (VHC)

El virus de la Hepatitis C (VHC) es la mayor causa de hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC) en todo el mundo. Una vacuna protectora no está disponible todavía y las opciones terapéuticas aun son limitadas. La terapia actual estándar, que es el uso de interferón- α -pegilado combinado con ribavirina, es a menudo difícil de tolerar y resulta en una respuesta viral sostenida en sólo 50% de los pacientes. Como consecuencia, el número de pacientes que se presentan con las secuelas a largo plazo de la hepatitis C crónica, incluyendo CHC, se espera que aumente aún más en los próximos 20 años. Ante este escenario, existe una urgente necesidad de desarrollar terapias más eficaces y mejor toleradas para la hepatitis C crónica. Una comprensión detallada del ciclo de vida viral respalda estos esfuerzos (Williams 2006).

El Virus de la Hepatitis C (VHC) es la infección crónica más común de transmitida por sangre en E.U., y está implicado en 40% de las enfermedades hepáticas crónicas. HCV fue



inicialmente aislado a partir del suero de una persona con hepatitis no-A, no-B en 1989 por Choo *et al.* Poco después de la clonación del VHC, este virus recién descubierto se encontró que era la causa de aproximadamente el 90% de las hepatitis no-A, no-B en E.U. (Chen and Morgan 2006).

1.5.1 Clasificación y variabilidad genética

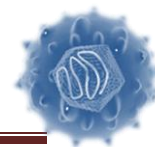
El VHC se clasifica dentro del género *Hepacivirus*, de la familia *Flaviviridae*, que incluye los flavivirus clásicos (por ejemplo, virus la fiebre amarilla, el dengue y la encefalitis transmitidos por garrapatas), los pestivirus animales (por ejemplo, el virus de la diarrea vírica bovina) y virus GB A (GBV-A), el GBV-B y VG-C.

El VHC tiene un genoma de ARN cadena sencilla y polaridad positiva que se compone de una región 5' no codificante (NCR), que incluye un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), un marco de lectura abierto que codifica las proteínas estructurales y no estructurales, y un 3' -NCR.

Las proteínas estructurales que forman la partícula viral, incluyen la proteína de la cápside (core) y glicoproteínas de envoltura E1 y E2. Las proteínas no estructurales incluyen la p7 de canal de iones, la proteasa NS2-3, la NS3 serin proteasa y helicasa de ARN, el polipéptido NS4A, las proteínas NS4B y NS5A y la polimerasa NS5B polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Moradpour, Penin et al. 2007).

Infección por el VHC es un proceso muy dinámico con una vida media viral de sólo unas pocas horas y la producción y el aclaramiento de un estimado de 10^{12} viriones por día en un individuo dado (Neumann, Lam et al. 1998).

Esta actividad replicativa alta, junto con la falta de una función de corrección de pruebas de la polimerasa RdRp viral, es la base de la elevada variabilidad genética del VHC. Estas propiedades son similares a los de la infección por VIH y proporcionan una razón de peso para el desarrollo y la aplicación de terapias antivirales de combinación.

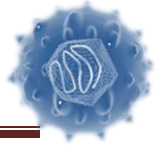


1.5.2 Genotipos VHC

Aislados de HCV se pueden clasificar en genotipos y subtipos²¹. Existen 6 genotipos principales que difieren en su secuencia de nucleótidos en un 30-35%. Los pacientes infectados con el genotipo 1 no responden tan bien a la terapia con interferón base como los infectados con los genotipos 2 ó 3. Dentro de un genotipo del VHC, varios subtipos (designados A, B, C y así sucesivamente) se puede definir que difieren en su secuencia de nucleótidos en un 20-25%. Las cuasiespecies término se refiere a la heterogeneidad genética de la población de genomas de HCV que coexisten en un individuo infectado (Simmonds, Bukh et al. 2005).

Tabla 1. Clasificación genética del VHC

Terminología	Homología	Definición
Genotipo (1-6)	66 – 69 %	Heterogeneidad entre virus
Subtipo (a, b, c, etc.)	77 – 80 %	Virus relacionados dentro de cada tipo
Aislado	81 – 90 %	Estudios del mismo subtipo en diferentes pacientes
Cuasiespecies	91 – 99 %	Variantes genéticas en un individuo



1.5.3 Estructura Molecular de VHC

1.5.3.1 Estructura del Virión

Aunque el emocionante progreso ha sido dirigido hacia la determinación de las estructuras del virión de algunos de los alfavirus y flavivirus relacionados, por ejemplo, el dengue virus, el VHC no ha sido definitivamente visualizado y su estructura aún no se ha elucidado. Basado en filtración y estudios de microscopía electrónica, las partículas del VHC son entre 40-70 nm de diámetro (Kuhn, Zhang et al. 2002; Wakita, Pietschmann et al. 2005).

Se cree que la proteína de la cápside (core) y las glicoproteínas de envoltura E1 y E2 son los componentes principales de proteína del virión. E1 y E2 son presumiblemente anclados a una envoltura de bicapa lipídica derivada de la célula infectada que rodea una nucleocápside compuesta de múltiples copias de la proteína core y el ARN genómico.

VHC circula en diversas formas en el huésped infectado y puede estar asociado con lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), ambas de las cuales parecen representar la fracción infecciosa, y también circula como viriones unidos a inmunoglobulinas y viriones libres. Esta característica puede explicar su baja densidad en el torrente sanguíneo e inusualmente heterogénea (pico de infectividad cerca de 1.10 g/mL) (Andre, Perlemuter et al. 2005).

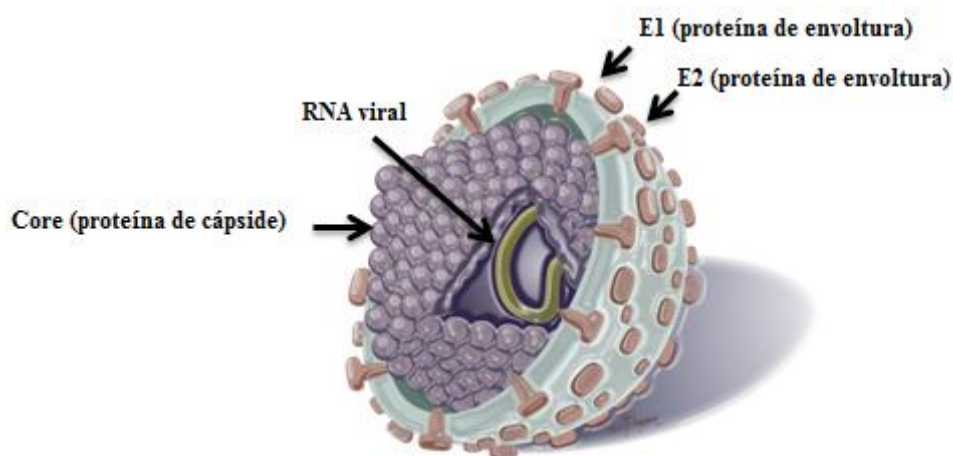
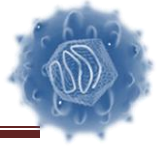


Fig 3. Partícula viral (VHC)

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



Traducción del marco de lectura abierto del VHC se obtiene un precursor de poliproteína que es co- y post-traduccionally procesado por proteasas celulares y virales en las proteínas maduras estructurales y no estructurales (Fig. 4). Las proteínas estructurales y el polipéptido p7 son procesados por la peptidasa señal de retículo endoplásmico (ER), mientras que las proteínas no estructurales son procesadas por dos proteasas virales, la proteasa NS2-3 y la serina proteasa NS3-4A.

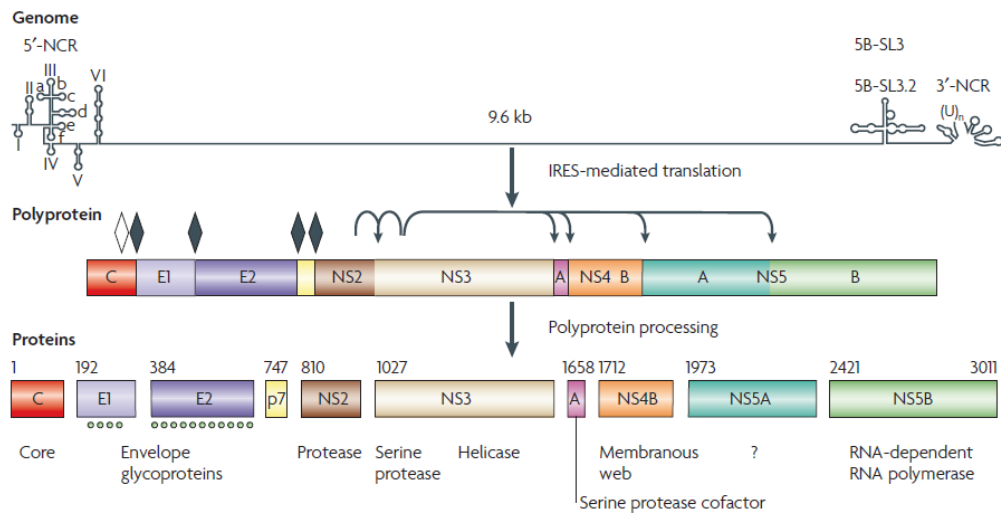
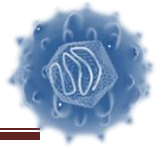


Fig. 4 Organización genética y procesamiento de la poliproteína de hepatitis C (VHC). El genoma de ARN tiene una longitud de 9.6 kb de cadena positiva está representado esquemáticamente en la parte superior. Simplificados estructuras secundarias de ARN en las regiones 5' y 3' no codificante (NCR) y el gen core, así como la NS5B del tallo-bucle 3 que actúa en el elemento de replicación *cis* (5B-SL3). La traducción mediada por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) da lugar a un precursor de poliproteína que es procesado en las proteínas maduras estructurales y no estructurales. El número de aminoácidos se muestra sobre cada proteína (VHC cepa H; genotipo 1a; número de acceso de GenBank AF009606). Diamantes sólidos indican sitios de escisión del precursor de la poliproteína del VHC por la peptidasa señal de retículo endoplásmico. El rombo abierto indica más procesamiento de C-terminal de la proteína core por la peptidasa del péptido señal. Las flechas indican cortes por NS2-3 VHC y proteasas NS3-4A. Los puntos en E1 y E2 indican la glicosilación de las proteínas de la envoltura (4 y 11 glicanos ligados a N, respectivamente, en la cepa de HCV H). Tenga en cuenta que el procesamiento de la poliproteína, que se ilustra aquí como un paso separado para mayor simplicidad, se produce co- y post-traduccionally (Moradpour, Penin et al. 2007).



1.5.3.2 Ciclo biológico del VHC

El hígado es el principal órgano blanco de la infección por VHC, sin embargo la infección de células B y de células dendríticas ha sido descrita. Los mecanismos que usa el VHC para ingresar al interior de los hepatocitos aún se desconocen. Sin embargo se han propuesto varias moléculas de superficie celular como probables receptores del VCH: la proteína traspanina (CD81), heparán sulfato (HS), DC-SING/L-SING, SRBI y el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Así mismo se han propuesto 2 mecanismos diferentes para explicar el ingreso del VHC al interior de la célula huésped; uno mediante la fusión directa del virus con la membrana plasmática y otro mediante endocitosis mediada por un receptor, siendo este último es el modelo más aceptado (Barth, Liang et al. 2006).

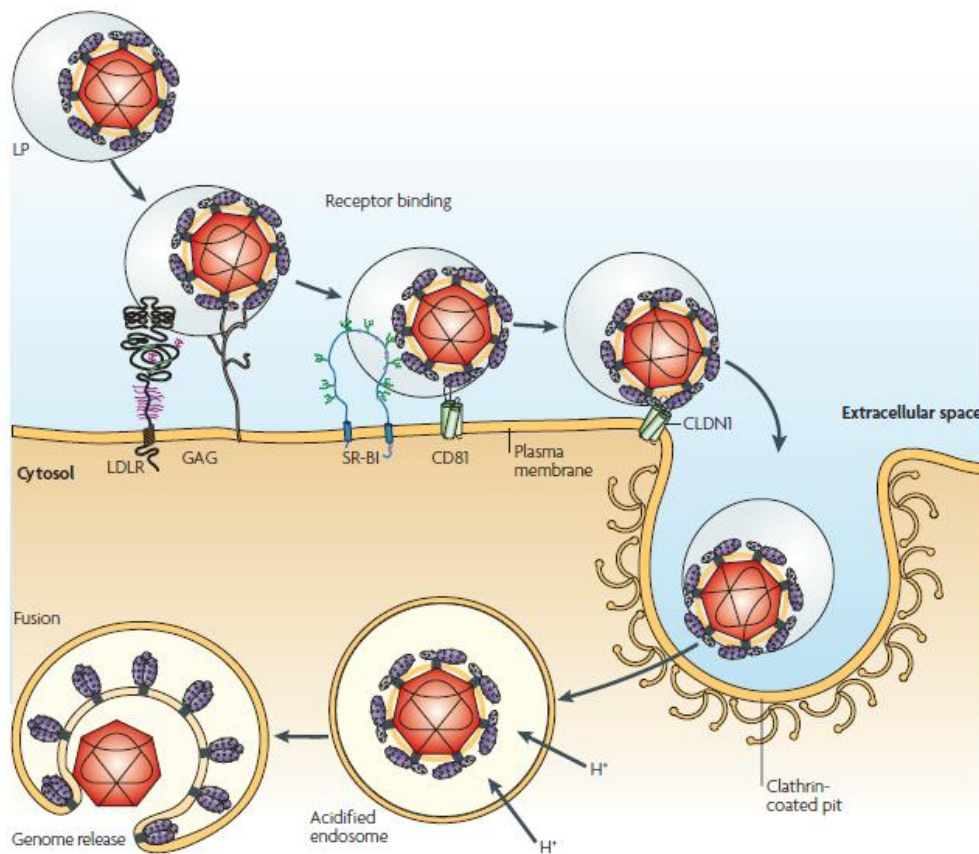
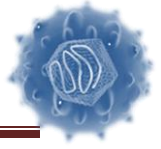


Fig. 5 Modelo actual para la entrada del Virus de la hepatitis C (VHC) (Moradpour, Penin et al. 2007).



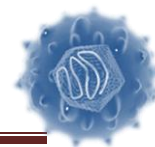
1.5.3.3 *Entrada del virus*

VHC sólo afecta a los humanos y chimpancés. Los hepatocitos son las principales células diana pero también ha sido reportado infección en células B, células dendríticas y otros tipos celulares. CD81, una proteína tetraspanina que se encuentra en la superficie de muchos tipos de células, incluyendo a los hepatocitos (Pileri, Uematsu et al. 1998), el receptor de LDL (LDLR) (Agnello, Abel et al. 1999), receptor eliminador clase B tipo I (SR-BI) (Scarselli, Ansuini et al. 2002) y, más recientemente, claudina-1 (Evans, von Hahn et al. 2007), entre otros, se han propuesto como receptores de VHC (Bartosch and Cosset 2006; Cocquerel, Voisset et al. 2006) (Fig. 5).

El receptor LDLR es un candidato atractivo debido a la asociación de VHC con LDL y VLDL. Sin embargo, su papel preciso aun falta determinarlo. Junto con los glicosaminoglicanos, el LDLR y otras proteínas de la superficie celular involucradas en la unión y el metabolismo de las lipoproteínas de suero pueden servir como recolectores primarios de partículas de VHC para una mejor adaptación a CD81 y los componentes adicionales del receptor (Fig.5). E2 del VHC también se une a DC-SIGN (Molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas acarreadora no-integrina 3) y L-SIGN (Molécula de adhesión intercelular específica de nódulos linfáticos/hígado acarreadora integrina 3).

L-SIGN es una lectina dependiente de calcio expresado en las células endoteliales sinusoidales hepáticas que pueden facilitar el proceso de infección por la captura del virus para la posterior interacción con hepatocitos. Tanto CD81 como SR-BI se unen a E2 y son necesarios más no suficientes para la entrada del VHC. Expresión de CD81 en líneas celulares derivadas de hepatocitos CD81-negativas confiere susceptibilidad a pseudopartículas de VHC (VHCpp) y VHCcc. El bloqueo de anticuerpos contra CD81 y SR-BI, soluble recombinante CD81, LDL oxidado ó baja expresión de CD81 regulada con siARN reduce la infectividad. Sin embargo, la expresión de CD81 y SR-BI en líneas celulares no derivadas de hepatocitos no confiere susceptibilidad a la infección por VHC, lo

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2

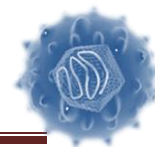


que nos indica que adicionales factores específicos de hepatocitos deben ser necesarios para la entrada del VHC.

El uso de un enfoque reiterativo de expresión-clonación en el componente de unión estrecha con claudina-1 fue identificado recientemente como un co-receptor de VHC (Evans, von Hahn et al. 2007). Claudina-1 se encontró que era esencial para la entrada del VHC en las células hepáticas y no hepáticas permisivas a la infección por VHC. Sin embargo, ciertos tipos de células resultaron ser no permisiva pesar de la expresión de CD81, SR-BI y Claudina-1, lo que indica que uno o más factores adicionales para la entrada del VHC aún no se han descubierto. Claudina-1 actúa en una fase avanzada del proceso de entrada, después de la unión del virus y su interacción con CD81. Curiosamente, otras moléculas asociadas han demostrado servir como (co-)receptores virales. En este contexto, el virus Coxsackie B requiere para su entrada la unión inicial a un receptor primario (acelerador de la degradación de los factores) en la superficie celular del lumen, seguida por la migración lateral del complejo virus-receptor hacia la unión estrecha, donde ocurre la interacción con el co-receptor CAR (coxsackievirus y receptor de adenovirus) y la absorción hacia la célula huésped (Coyne and Bergelson 2006).

Futuros estudios deben aclarar si el VHC sigue un camino similar para entrar en la célula. El virus se introduce por endocitosis mediada por clatrina (Blanchard, Belouzard et al. 2006), con tránsito a través de un endosoma, compartimento con pH ácido (Koutsoudakis, Kaul et al. 2006; Tscherne, Jones et al. 2006) y presumiblemente fusión de membranas endosomales. La base estructural para la fusión de membranas inducida por bajo pH ha sido dilucidado para liberación de flavivirus y alfavirus, incluyendo el virus del dengue y SemLiki Forest virus (Gibbons, Vaney et al. 2004; Modis, Ogata et al. 2004).

Las proteínas de la envoltura de estos virus tienen un péptido de fusión interno que es expuesto durante la reordenación de dominio mediado por bajo pH y por trimerización de la proteína. Los andamios de estos son llamados proteínas de fusión de clase II y son muy similares, lo que sugiere que la entrada de todos los virus de la familia *Flaviviridae*,



incluyendo el VHC, puede incluir la etapa de fusión de clase II. Sin embargo, los mecanismos implicados en la activación de VHC por fusión inducida por bajo pH, la etapa de fusión, y la identidad del péptido(s) de fusión aún no han sido caracterizados.

1.5.3.4 Replicación del VHC

Una vez que el virus se encuentra dentro de la célula huésped, el ARN viral se libera de la nucleocápside hacia el citoplasma e inmediatamente es traducido para generar proteínas del VHC. La mayoría de las proteínas que se producen permanecen estrechamente asociadas a las membranas del RE, sugiriendo que la replicación del VHC está asociada con el RE. Al mismo tiempo a partir de la hebra positiva de ARN se genera la hebra negativa, que funciona como un intermediario de replicación (molde) para la síntesis de nuevas hebras positivas de ARN. Finalmente la hebra positiva de ARN interactúa con las proteínas estructurales y no estructurales recién sintetizadas para ensamblar nuevas partículas virales, que son transportadas desde el RE, pasando por el aparato de Golgi, finalmente para ser exportadas fuera de la célula e ir a infectar a otras células (Barth, Liang et al. 2006). (Fig.6)

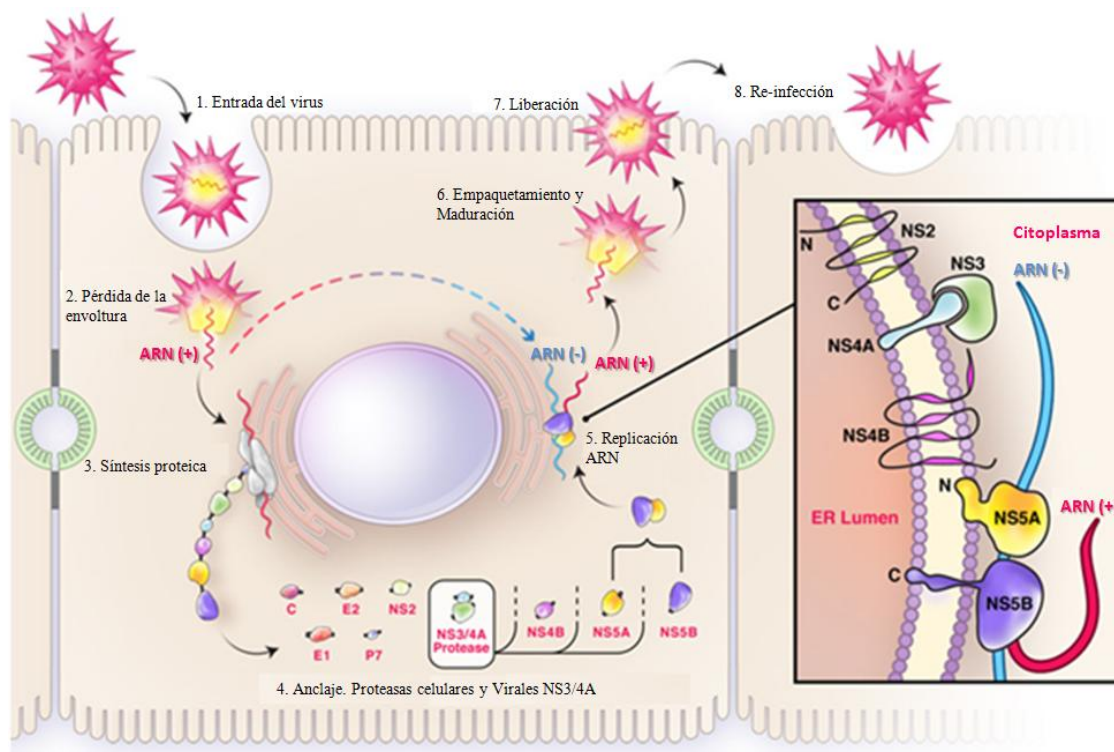
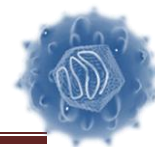
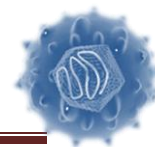


Fig. 6 Ciclo de replicación del VHC

1.6 Ciclooxygenasa-2

La ciclooxygenasa 2 (cyclooxygenase-2, COX-2), o prostaglandina endoperoxidosintasa E2 (prostaglandin endoperoxide synthase-2, PGES-2), es la isoforma inducible de la ciclooxygenasa (COX), la velocidad limitante de la enzima que cataliza el paso inicial de la transformación ácido-metabólico del ácido araquidónico a prostenoides. Por el contrario, cyclooxygenasa-1 (COX-1), o prostaglandina endoperoxidosintasa-1 (PGES-1), representa la isoforma constitutiva de COX (Otto and Smith 1995). Ambas isoformas pertenecen a la familia de las mieloperoxidasas y están lejanamente relacionadas con otras oxigenasas de ácidos grasos presentes en plantas y organismos inferiores (Dey, Keller et al. 2003; Jarving, Jarving et al. 2004).

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



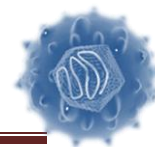
La presencia de una isoforma inducible de ciclooxigenasa fue sugerida inicialmente por el trabajo de Levine, *et al.* quienes reportaron un incremento transitorio en la producción de la prostaglandina E2 (PGE2) y la prostaglandina F2 α (PGF2 α) en células caninas de riñón seguida de una estimulación con mitógenos, promotores tumorales y carcinógenos (Hassid and Levine 1977; Pong, Hong et al. 1977; Ohuchi and Levine 1978).

Es importante destacar que la producción de estas prostaglandinas recién sintetizados fue atenuada por la síntesis de proteínas e inhibidores de la transcripción, lo que sugiere la necesidad de la síntesis *de novo* de una nueva actividad de la ciclooxigenasa distinta de la actividad constitutiva de COX-1 (Pong, Hong et al. 1977; Ohuchi and Levine 1978). Hla *et al.* reportaron la clonación, secuenciación y expresión del gen de la ciclooxigenasa inducible en células humanas, que fue nombrado COX-2 (Hla and Neilson 1992).

Trabajos posteriores demostraron que COX-1 y COX-2 eran reguladas diferencialmente (Ristimaki, Garfinkel et al. 1994). En notable contraste con la expresión constitutiva de COX-1, los niveles de expresión de COX-2 aumentó transitoriamente en las células estimuladas por citoquinas proinflamatorias (Jones, Carlton et al. 1993)

En conjunto, estas observaciones condujeron a la noción de que mientras que la COX-1 contribuye a la homeostasis en funciones celulares (Otto, DeWitt et al. 1993), COX-2 contribuye a los procesos de enfermedad, incluyendo la hiperalgesia, la inflamación y el cáncer (Seibert, Zhang et al. 1994; Williams, Mann et al. 1999).

Las funciones y cantidad celular de COX-1 y COX-2 son, sin embargo, más compleja de lo que inicialmente se postuló. Por ejemplo, la COX-2 se expresa constitutivamente en ciertos órganos y tejidos donde regula las respuestas fisiológicas (Harris, McKanna et al. 1994; Dinchuk, Car et al. 1995; Kaufmann, Worley et al. 1996), mientras que la COX-1 puede ser sobreexpresada en respuesta al daño y a la diferenciación celular (Ueda, Yamashita et al. 1997; Bogar, Bartula et al. 1999). Los resultados de los estudios llevados a cabo en ratones *knockout* COX-1 y COX-2 subrayan aún más el rol complejo de la COX-2 y COX-1 en las funciones celulares. Por ejemplo, a pesar de su papel en la inducción de la inflamación, la



COX-2 es también necesaria para la resolución de la respuesta inflamatoria (Langenbach, Loftin et al. 1999).

El descubrimiento de la COX-2 se abrió una nueva frontera en la investigación del cáncer y ha estimulado una intensa investigación que nos permite la comprensión de su contribución en la tumorigénesis. Después de los informes iniciales de la sobreexpresión de COX-2 en el cáncer colorrectal, se encontró en varios tumores epiteliales una expresión constitutiva de COX-2. Además, la evidencia reciente indica que la COX-2 se sobreexpresa en varios tumores malignos hematológicos, lo que sugiere, por lo tanto, una mayor participación de la COX-2 en la tumorigénesis (Rizzo 2011).

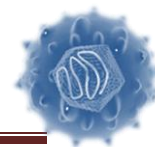
1.6.1 Características moleculares y bioquímicas de COX-2

1.6.1.1 Gen COX-2

El gen que codifica para la COX-2 humana se localiza en el cromosoma 1 (1q25.2-q25.3) y comparte aproximadamente 60% de homología con la COX-1. El gen COX-2 es de aproximadamente 8.3 kb de largo, está compuesto de 10 exones y 9 intrones, y se transcribe en tres variantes ARNm poliadenilado de 2.8, 3.2 y 4.6 kb, las cuales se expresan en un tejido y estímulo específico (Appleby, Ristimaki et al. 1994; Tazawa, Xu et al. 1994).

Variantes genéticas adicionales de COX-2 se producen mediante corte y empalme alternativo del ARNm y el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). En la actualidad, la significancia de estas variantes no se comprende enteramente, aunque hay evidencia de que podrían tener importantes funciones fisiopatológicas (Roos and Simmons 2005; Bi, Yang et al. 2010).

En contraste con el promotor de COX-1, la región del promotor de COX-2 posee características de un gen de respuesta temprana inmediata. En consecuencia, la región 5' no traducida (UTR) contiene una caja TATA, un potenciador/CCATT de unión a proteína (C/EBP), y sitios de unión putativos para varios factores de transcripción, incluyendo, entre otros, el elemento de respuesta a AMPc proteína de unión (CREB), el factor nuclear κ B



(NF- κ B), a la proteína de activación-1 (AP-1), el factor nuclear para la interleucina-6 (NF-IL6), y el factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT). El 3'-UTR contiene varios elementos ricos en AU (ARE) que son responsables de la degradación rápida y vida media corta del mRNA de COX-2 (Kraemer, Meade et al. 1992; Chen and Shyu 1995).

1.6.1.2 Proteína COX-2

El gen COX-2 codifica para una proteína homodimérica de un tamaño de 604 aminoácidos, la cual es altamente similar en estructura y actividad enzimática a COX-1. Análisis por cristalografía en rayos X revelaron la presencia de varios dominios funcionales dentro de N-terminal y C-terminal de los monómeros de COX-2, el cual regula la localización celular de COX-2, anclaje a membrana y actividad catalítica (Fig.7) (Garavito, Malkowski et al. 2002).

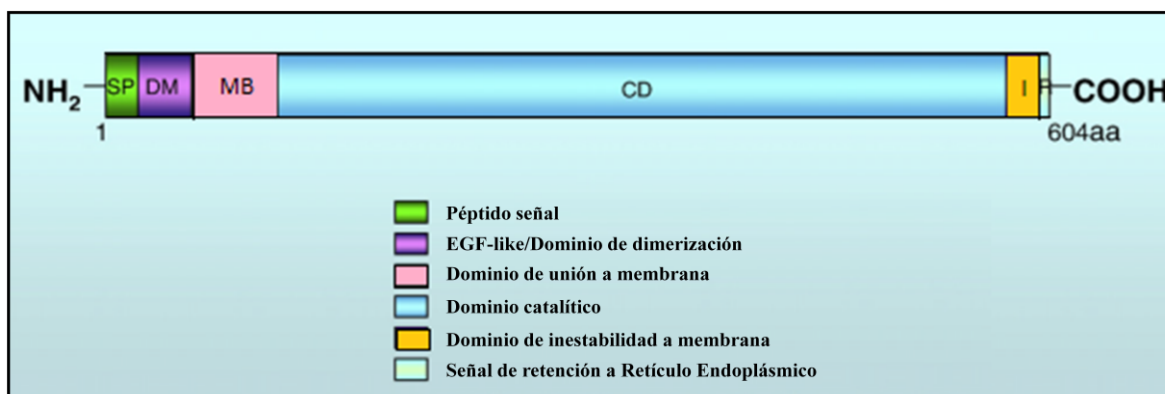
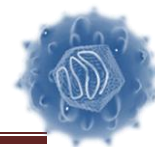


Fig.7. Representación esquemática de la estructura primaria de la proteína COX-2
(Garavito, Malkowski et al. 2002)

Empezando del extremo N-terminal, el dominio del péptido señal hidrofóbico dirige los polipéptidos nacientes de COX-2 hacia el lumen del RE.

Notablemente, el dominio del péptido señal de COX-2 es menor de 17 aminoácidos comparado con el dominio del péptido señal de COX-1. El dominio de dimerización contiene un módulo similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y es responsable de la formación de los homodímeros de COX-2. El dominio de unión a la membrana se compone de cuatro hélices cortas α anfipáticas que ancla la COX-2 a una sola membrana de

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2

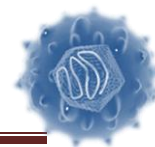


la bicapa lipídica en el lumen del RE y en las membranas extearene e intearene de la envoltura nuclear. El dominio globular catalítico, que constituye el grueso de la proteína COX-2, está formado por dos lóbulos de interconexión distintos que contienen el sitio activo de la ciclooxigenasa y el sitio activa de peroxidasa, que están separadas por el grupo hemo prostético.

El sitio de la ciclooxigenasa es un canal largo, hidrofóbico, estrecho y sin salida que se extiende dentro del dominio catalítico globular. La entrada del canal está enmarcado por cuatro hélices anfipáticas del dominio de unión a la membrana. El sitio catalítico de COX-2 es 17% más ancho que el canal del sitio catalítico de COX-1 debido a la sustitución de isoleucina en la posición 523 en COX-1 por valina en la posición 509 de COX-2. El sitio catalítico más amplio de la COX-2 permite la unión de sustratos voluminosos e inhibidores selectivos de COX-2 . El dominio catalítico contiene varios aminoácidos funcionales, incluyendo Tyr-371, un residuo conservado que es esencial para la catálisis (Luong, Miller et al. 1996; Garavito, Malkowski et al. 2002).

El sitio activo peroxidasa está formada como una hendidura lejana de la membrana del lumen del RE. Al final de C-terminal, COX-2 contiene un motivo inestabilidad de 27 aminoácidos, que está implicado en la regulación de la degradación de COX-2, y una secuencia de cuatro aminoácidos que constituye la señal de retención del RE. Similar a la COX-1, COX-2 se somete a modificaciones post-traduccionales las cuales consisten principalmente en N-glicosilación en varios residuos de asparagina. Hay al menos cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (Asp53, Asp130, Asp396 y Asp580) distribuidas en el dominio catalítico de COX-2. N-glicosilación en Asp53, Asp130 y Asp396 regula el plegamiento de COX-2 en una conformación activa de 72 kDa (Otto, DeWitt et al. 1993; Mbonye, Wada et al. 2006).

La N-glicosilación de Asp580 es variable, y cuando está presente da lugar a una proteína COX-2 de 74 kDa. La importancia de la N-glicosilación en Asp580 no está bien definido. Sin embargo, Sevigny *et al.* detectaron un aumento de la actividad catalítica COX-2



asociada con la remoción de la N-glycosylation en Asp580. No se conoce si las células tumorales expresan preferentemente una isoforma de la COX-2 que no está glicosilada en Asp580 (Otto, DeWitt et al. 1993; Sevigny, Li et al. 2006).

Además de la N-glicosilación, COX-2 se somete a S-nitrosilación por el óxido nítrico que es producido por la óxido nítrico sintasa. Kim *et al.* demostraron una interacción física entre la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y COX-2 resultando en una S-nitrosilación de COX-2 en la cisteína 256. Es importante destacar que esta modificación mejora la actividad catalítica de COX-2. Dado que la producción de óxido nítrico por iNOS se incrementa durante los procesos inflamatorios, la interacción entre la iNOS y COX-2 podría representar un mecanismo relevante de activación de COX-2 durante la inflamación impulsada por la tumorigénesis (Kim, Huri et al. 2005).

1.6.2 Localización intracelular de COX-2

Como se muestra en la figura 8, COX-2 está localizado principalmente en el lumen del RE, donde el medio ambiente oxidante favorece la adecuada dimerización, y en la envoltura nuclear. La localización nuclear de la COX-2 es consistente con su papel regulador en la mitogénesis.

La presencia de receptores nucleares, que han demostrado mediar algunos de los efectos mitogénicos de prostaglandinas derivadas de COX-2, subrayan la importancia funcional de COX-2 en la localización nuclear (Morita, Schindler et al. 1995; Wang, Wang et al. 2004). Hay evidencia de que, en las células tumorales, COX-2 se localiza en las mitocondrias y en cuerpos lipídicos [42,43] (Fig. 8). La localización intracelular de la COX-2 a la mitocondria desempeña un papel importante en la protección contra la apoptosis inducida por estrés oxidativo, mientras que la ubicación de la COX-2 en los cuerpos lipídicos críticamente influye en el crecimiento del tumor, probablemente al funcionar como una fuente adicional intracelular para el suministro continuo de prostaglandinas (Liou, Aleksic et al. 2005; Accioly, Pacheco et al. 2008).

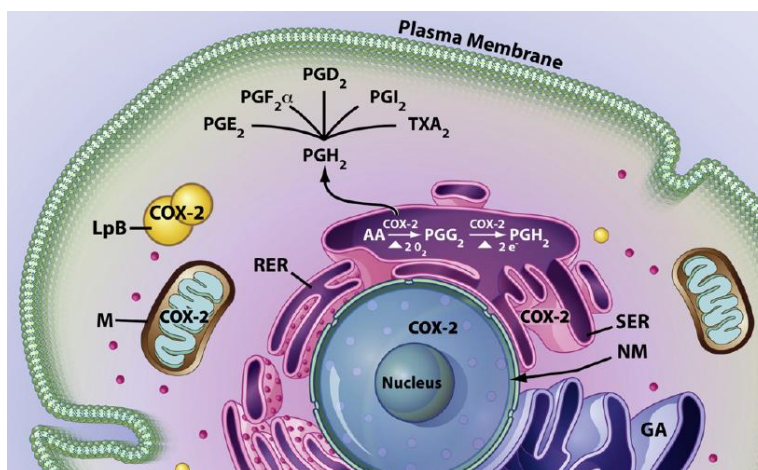
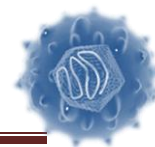


Fig. 8. Localización celular y actividad enzimática de la COX-2. Se muestra localización subcelular COX-2 en el RE, núcleo, mitocondrias (M) y los cuerpos lipídicos (LpB) (Rizzo 2011).

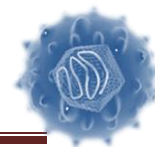
1.7 COX-2 Y EL HÍGADO

1.7.1 Papel de la COX-2 en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas

Johnston y Kroening (Johnston and Kroening 1996) demostraron que los hepatocitos de rata, incluso ante estímulos apropiados, no expresaban COX-2, a diferencia de otras células intrahepáticas como las células de Kupffer y las células estelares o de Ito. Sin embargo, los hepatocitos fetales de rata sí expresan COX-2, perdiendo esta facultad con su diferenciación a hepatocitos adultos. La inhibición de la inducción de la expresión de la COX-2 en hepatocitos adultos de rata depende de factores de transcripción de la familia de los C/EBP que actuarían en el promotor del gen de la COX 2, debido al cambio de expresión de las isoformas de C/EBP con la diferenciación celular (Callejas, Bosca et al. 2000). De este hallazgo se desprende que la expresión de la COX-2 por los hepatocitos adultos puede ser un marcador de desdiferenciación celular.

En el hígado las PG se han involucrado, fundamentalmente, en los procesos de regeneración hepática mediante la estimulación de la proliferación de los hepatocitos (Tsuji, Okamoto et al. 1993; Adachi, Nakashima et al. 1995; Casado, Callejas et al. 2001;

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2

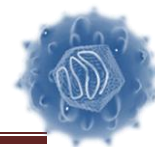


Rudnick, Perlmutter et al. 2001), en la remodelación tisular (Casado, Callejas et al. 2001) y en la hipertensión portal (Sitzmann, Bulkley et al. 1989; Wu, Li et al. 1991; Fernandez, Garcia-Pagan et al. 1996; Graupera, Garcia-Pagan et al. 2003).

En relación con el primer proceso, en un modelo animal de rata se observó cómo los factores de crecimiento de hepatocitos y epidérmico provocaban la activación de PLA₂ y la liberación de AA, con la producción de PG que actuarían como mediadores autocrinos y provocarían el aumento de síntesis de ADN (Adachi, Nakashima et al. 1995). Estudios experimentales más recientes han puesto de manifiesto que esta producción de PG depende fundamentalmente del aumento de expresión de COX-2 (Casado, Callejas et al. 2001; Rudnick, Perlmutter et al. 2001).

El segundo proceso establecería una relación entre las PG y la COX-2 con la fibrogénesis. En cultivos de hepatocitos de rata se demostró la síntesis y liberación a la matriz extracelular de metaloproteinasas como respuesta al añadir al medio de cultivo PGE₂, siendo ésta paralela al nivel de expresión de la COX-2 (Callejas, Bosca et al. 2000). En la patogenia de la hipertensión portal, mediante estudios de modelos animales, se ha implicado a las PG, fundamentalmente la PGI₂, en la vasodilatación e hiperemia esplácnica (Sitzmann, Bulkley et al. 1989; Wu, Li et al. 1991; Fernandez, Garcia-Pagan et al. 1996).

Otros estudios más recientes han puesto de manifiesto que la producción de tromboxano 2, derivado de la COX-2, tiene un papel fundamental en el aumento de la resistencia vascular a nivel sinusoidal (Graupera, Garcia-Pagan et al. 2003; Yokoyama, Xu et al. 2003), aunque el papel patogénico de las PG, en la hipertensión portal sinusoidal aún no está establecido (Rockey 2003).



1.7.2 Implicación de COX-2 en las hepatopatías crónicas

1.7.2.1 Hepatopatía vírica

Los mecanismos patogénicos de la lesión hepática por virus no están completamente definidos. En estudios recientes se están generando evidencias, cada vez más sólidas, de la participación de la COX-2 en ellos. En este sentido, Cheng *et al* (Cheng, Chan et al. 2002) observaron un incremento de la expresión hepatocelular de COX-2, tanto en la proteína como en el ARNm, en pacientes con hepatitis crónica por el virus B, en comparación con pacientes con esteatohepatitis no alcohólica y con hígado normal. Estos autores no encontraron relación entre el grado de expresión de COX-2 con el índice de actividad histológica ni con las concentraciones séricas de ADN del virus de la hepatitis B ni de transaminasas.

Tampoco encontraron cambios significativos en la expresión de COX-2 en el hígado de pacientes tratados con respuesta favorable y con mejoría de la actividad necroinflamatoria. En otro estudio (Cheng, Imanishi et al. 2002), en el que se incluía a pacientes con hepatopatía crónica de origen viral, se demostraba un incremento de la expresión citoplasmática de COX-2 en hepatocitos relacionado con la progresión de la fibrosis pero no con la actividad inflamatoria. Los autores también observaron relación entre los títulos de ácido hialurónico en suero y la expresión intrahepática de la COX-2, lo que apuntaría a la existencia de una asociación patogénica entre la expresión de la COX-2 y la fibrogénesis hepática (Fig. 9).

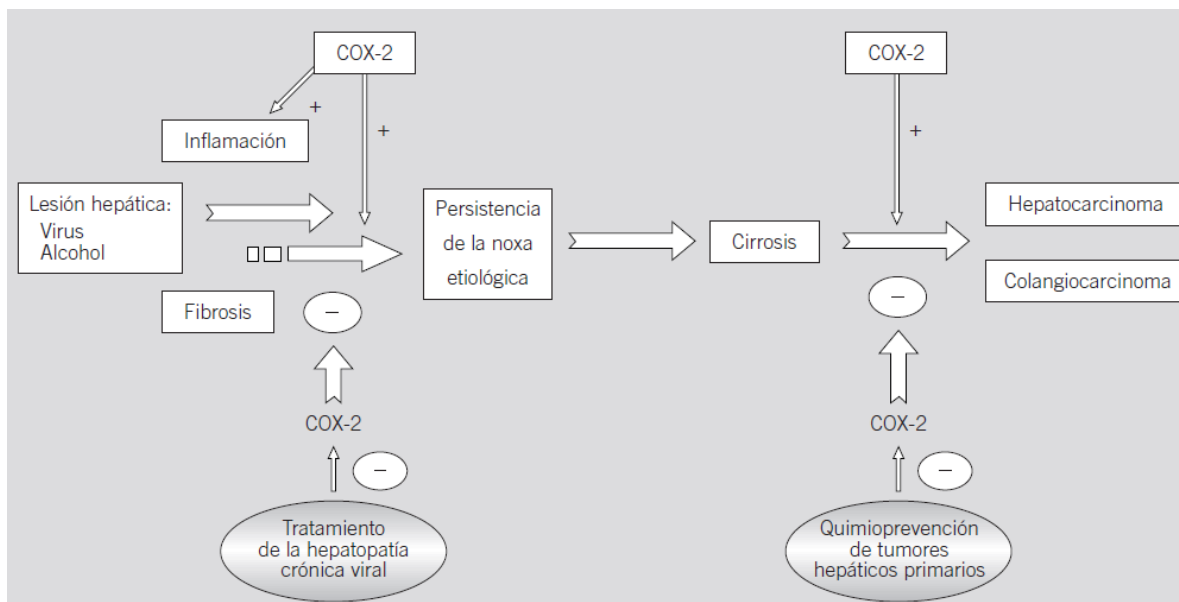
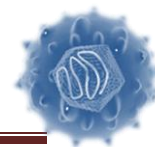
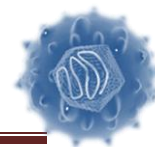


Fig.9 Papel fisiopatológico de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en las enfermedades del hígado. La lesión hepática inducida por virus o alcohol desencadena fenómenos de inflamación y fibrosis, en los que se hallaría implicada la COX-2, que se identifica entonces como una posible diana terapéutica en esta región. Ante la persistencia de la noxa etiológica, la lesión hepática puede progresar hasta la aparición de cirrosis y hepatocarcinoma. Dado que la COX-2 cumple un papel relevante en la carcinogénesis del hepatocarcinoma y del colangiocarcinoma, la inhibición farmacológica de esta enzima podría ser una estrategia potencial para la quimioprevención de estas neoplasias. (Nunez Martínez, Clemente Ricote et al. 2003)

Por otro lado, a pesar de los resultados contradictorios obtenidos en diferentes ensayos clínicos en pacientes con hepatitis crónica viral (Anderson, Zeng et al. 1997; Zarski, Maynard-Muet et al. 1998), se ha propuesto el posible efecto potenciador de la inhibición de la COX-2, mediante antiinflamatorios no esteroideos, sobre la actividad antivírica del interferón alfa (Andreone, Cursaro et al. 1993; Giambartolomei, Artini et al. 1999). En este sentido, un estudio experimental demostró que el efecto sinérgico antiviral de la indometacina con el interferón alfa estaría en relación con la activación de vías de señalización intracelular que convergen en la activación de las proteínas STAT, que potenciarían la activación de genes dependientes de la acción del interferón alfa (Giambartolomei, Artini et al. 1999). Por último, en un estudio con un número limitado de pacientes con hepatitis por el virus B, que fueron tratados con indometacina, se observó una importante inhibición de la replicación viral (Kapicioglu, Sari et al. 2000).



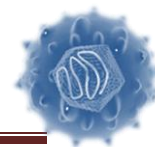
1.7.2.2 COX-2 y hepatocarcinoma

El interés del estudio de la relación de la COX-2 con la hepatocarcinogénesis ha derivado de la implicación de COX-2 en la carcinogénesis en otros tejidos, principalmente en el cáncer de colon (Ota, Bamba et al. 2002). La implicación de la COX-2 y de las PG derivadas de su activación, PGE2 fundamentalmente, en la iniciación y el mantenimiento del crecimiento y la supervivencia de las células tumorales se ha relacionado con la inducción de angiogénesis vía factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Masferrer, Leahy et al. 2000; Williams, Tsujii et al. 2000; Cianchi, Cortesini et al. 2001), con la inhibición de la vía apoptótica y el aumento de la adhesión a la matriz extracelular de las células que sobreexpresaban COX-2 (Tsujii and DuBois 1995).

Estudios experimentales han valorado mecanismos carcinogénicos en la región hepática relacionados con la COX-2. En cultivos de hepatocitos tumorales provenientes de pacientes con infección por el virus de la hepatitis C y mediante transfección de la proteína del Core del virus de la hepatitis C a líneas celulares humanas de hepatoblastoma (células HepG2), Tai *et al* (Tai, Tsai et al. 2000) demostraron la activación de NF- κ B, que es un factor de transcripción que regula la expresión génica de la COX-2, y su implicación en la resistencia a la apoptosis celular. En otro estudio realizado en líneas celulares humanas de hepatoma, se observó cómo un inhibidor selectivo de COX-2, el NS-398, producía una inhibición de la proliferación de las células que sobreexpresaban COX-2, mediante una disminución de la producción de PGE2 asociada a alteraciones de la progresión del ciclo celular y de la tasa de apoptosis (Hu, Yu et al. 2003).

Esta relación entre la expresión de COX-2, la inhibición de la apoptosis y el aumento de la proliferación celular también se ha demostrado en otros estudios mediante la supresión de la actividad de la COX-2 con sulindaco, nimesulida o NS-398. Todos estos hallazgos indicarían una base racional para el uso de inhibidores de la COX-2 en la quimioprevención del carcinoma hepatocelular (Nunez Martinez, Clemente Ricote et al. 2003) (Fig. 9).

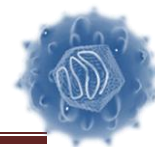
Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



Por último, existen estudios experimentales que relacionan la expresión de COX-2 y la capacidad de invasión celular por líneas celulares de hepatoma, vía activación de metaloproteinasas por la PGE2 producida por la proteína X del virus B (Lara-Pezzi, Gomez-Gaviro et al. 2002), aunque otros autores apuntan a su actuación como un factor permisivo de la invasión celular tumoral pero no suficiente en sí mismo. En 1999 se publicaron tres artículos que han servido de referencia en la implicación entre la expresión de COX-2 en el desarrollo del carcinoma hepatocelular.

Koga *et al* (Koga, Sakisaka et al. 1999) estudiaron la expresión de la COX-2 en muestras de hígado de 44 pacientes con carcinoma hepatocelular. Los autores encontraron un importante aumento de la expresión de COX-2 en el carcinoma hepatocelular bien diferenciado y una disminución de su expresión en relación con la pérdida de la diferenciación de las células tumorales, por lo que señalan que la COX-2 cumple un papel importante en los estadios iniciales de la hepatocarcinogénesis y en la dediferenciación de estas células. Los otros dos estudios, publicados por Shiota *et al* (Shiota, Okubo et al. 1999) y Kondo *et al* (Kondo, Yamamoto et al. 1999), corroboran estos hallazgos. Este último estudio demostró una correlación significativa entre la presencia de inflamación en el tejido peritumoral y el nivel de expresión de COX-2 en este tejido. Además, estos autores encontraron una clara relación entre la expresión de COX-2 y la presencia de cirrosis, así como con una menor supervivencia.

Estudios más recientes no aportan nuevos datos o plantean controversia debido a sus resultados contradictorios. Así, Morinaga *et al* (Morinaga, Yamamoto et al. 2002) investigaron la expresión de COX-2 en el tejido tumoral y peritumoral de pacientes con carcinoma hepatocelular. Los autores observaron una mayor expresión de ARNm de la COX-2 en el tejido no tumoral, así como que el nivel de expresión no presentaba diferencias significativas entre la hepatitis crónica y la cirrosis. Además encontraron una correlación positiva entre los niveles de expresión de la COX-2 con el índice de actividad histológica, las concentraciones séricas de GPT y el índice Ki-67, indicador de la actividad regenerativa. Los autores concluyeron que la COX-2 estaría más implicada en la patogenia de la lesión hepática que en la génesis del carcinoma hepatocelular (Nunez Martinez, Clemente Ricote et al. 2003).



Capítulo II. ANTECEDENTES

Hepatitis C Virus Stimulates the Expression of Cyclooxygenase-2 via Oxidative Stress: Role of Prostaglandin E₂ in RNA Replication

Gulam Waris and Aleem Siddiqui*

Department of Microbiology and Program in Molecular Biology, University of Colorado Health Sciences Center, 4200 E. 9th Ave., Denver, Colorado 80262

Received 29 November 2004/Accepted 5 April 2005

RESEARCH

Open Access

Role of HCV Core gene of genotype 1a and 3a and host gene Cox-2 in HCV-induced pathogenesis

Shah Jahan, Saba Khaliq, Bushra Ijaz, Waqar Ahmad and Sajida Hassan*

LIVER

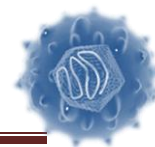
Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins

O Núñez, A Fernández-Martínez, P L Majano, A Apolinario, M Gómez-Gonzalo, I Benedicto, M López-Cabrera, L Boscá, G Clemente, C García-Monzón, P Martín-Sanz

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 302: G1264–G1273, 2012.
First published March 22, 2012; doi:10.1152/ajpgi.00237.2011.

Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) induction is implicated in the antioxidative and antiviral activity of acetylsalicylic acid in HCV-expressing cells

Ana María Rivas-Estilla,¹ Owen Lloyd Bryan-Marrugo,¹ Karina Trujillo-Murillo,¹ Diana Pérez-Ibave,¹ Claudia Charles-Niño,² Cesar Pedroza-Roldan,² Clara Ríos-Ibarra,¹ Eda Ramírez-Valles,¹ Rocío Ortiz-López,^{1,6} María Cristina Islas-Carbajal,³ Natalia Nieto,⁴ and Ana Rosa Rincón-Sánchez⁵

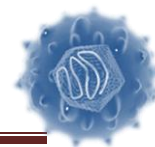


Capítulo III. JUSTIFICACIÓN

La Hepatitis C es un problema de salud pública mundial causado por el Virus de la Hepatitis C que afecta alrededor de 3 % de la población mundial y por esto es considerado un grave problema de salud pública mundial, sin embargo a pesar de ello, en la actualidad no está bien esclarecido cuales son los mecanismos en los cuales el VHC tiene una participación en la supervivencia celular.

Además es importante el esclarecimiento de cómo algunos pacientes que presentan una infección por el VHC no desarrollan una cronicidad en la enfermedad y de manera espontánea resuelven la misma, en cambio más del 80% de las personas infectadas desarrollan cronicidad en un periodo de hasta 30 años en donde sólo el 4% de ellos llega a presentar Carcinoma Hepatocelular, y es tan bajo este porcentaje porque la mayoría de las personas infectadas muere antes de poder desarrollar esta condición.

Con base a los antecedentes de ésta área de investigación no está bien esclarecido cuál es la participación de cada una de las proteínas virales en la activación de COX-2, además es importante elucidar la participación de la enzima COX-2, cuando se presenta una infección por el VHC, y cómo es que las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas en la mitocondria por la absorción de Ca^{+} que se encuentra en una concentración incrementada en citoplasma por su liberación a partir del Retículo endoplásmico por una desestabilización en su membrana por la respuesta de proteínas no plegadas en el lumen del mismo, en este caso, la sobreexpresión de proteínas virales, activándose vía NF-kB, lo cual se ha reportado una activación de la expresión de COX-2.



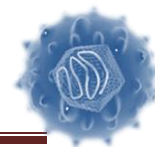
Capítulo IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la participación de las proteínas virales estructural (E2) y no-estructural (NS5A) del virus de la hepatitis C en la regulación de la expresión de COX-2

Objetivos específicos

1. Caracterizar los plásmidos que expresan las proteínas estructural E2, no estructural NS5A y del replicón subgenómico del virus de la hepatitis C.
2. Evaluar los niveles de COX-2 en las líneas celulares HuH-7 y HepG2 en presencia de las proteínas del VHC.
3. Evaluar si existe diferencia en los niveles de COX-2 entre las líneas celulares HuH-7 y HepG2 cotransfectadas con plásmidos que expresan las proteínas E2, NS5A y COX-2.



Capítulo V. MATERIALES

5.1 Reactivos

5.1.1 Reactivos de uso general

- Alcohol etílico (Jalmek)
- Alcohol metílico (MERK)
- Alcohol Isopropílico (MERK)
- SDS (Sigma Aldrich)
- Agua Estéril

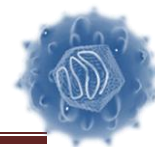
5.1.2 Cultivo celular

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

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

5.1.3 Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR)

- TRIzol® (Invitrogen)
- Cloroformo (J.T. Baker)
- Isopropanol (MERK)
- Agua DEPC
- ARNse OUT™ (Invitrogen)



- PCR Master mix 2x universal TaqMan® (Invitrogen)
- SYBR® Green qPCR SuperMix (ABI PRISM®)
- Iniciadores Forward y Reverse (Invitrogen):

TABLA.2. Oligonucleótidos para amplificar gen NS5A de VHC genotipo 1b

Oligonucleótidos	Secuencia	Posición
Forward	5'- AACCATGACTCCCCAGAC- 3'	736
Reverse	5'- CCATCTCCTGCCGCCACA-3'	779

Producto amplificado= 61 pb del gen NS5A

TABLA.3 Oligonucleótidos para amplificar gen E2 de VHC genotipo 1b

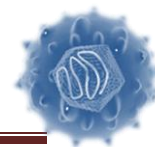
Oligonucleótidos	Secuencia	Posición
Forward	5'- CGGTGTAGGGTCAGTGGT- 3'	960
Reverse	5'- AAGGAAGAGCAGCACGAC- 3'	1006

Producto amplificado= 64 pb del gen E2

5.1.4 Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot

Reactivos para preparar Extracción de proteínas:

- EDTA (Sigma)
- MgCl₂
- DTT (Roche)
- PMSF (Sigma)
- Inhibidores de Proteasas (Complete, Roche)
- Reactivo de Bradford (Bio-Rad)



Reactivos para preparar Geles de poliacrilamida:

- Poliacrilamida 30%
- Buffer de fosfatos pH 8.8
- Buffer de fosfatos pH 6.8
- PSA (Bio-Rad)
- TEMED (Bio-Rad)
- Marcador de peso molecular: Protein Dual Color Standards (Bio-Rad)
- Jugo azul
- β -mercaptoetanol (Bio-Rad)

Reactivos para WB:

- Tritón 100X (Sigma Aldrich)
- Leche descremada light Svelty en polvo
- Metanol (J.T. Baker)
- Anticuerpo IgG anti COX-2 de conejo (ABCAM)
- Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con HRP (Santa Cruz biotechnology, Inc.)
- Reactivo quimioluminiscente (Luminol, Santa Cruz biotechnology, Inc.)

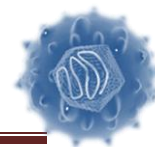
5.2 Materiales

5.2.1 Material de uso general

- Micropipetas automáticas (Pipet lite; Rainin) de volumen variable:
 - 1-10 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L
- Puntillas para micropipetas
- Tubos Eppendorf de 0.2, 0.6, 1.5 y 2 mL

5.2.2 Cultivo celular

- Pipetas serológicas estériles de 5 y 10 mL (Corning)
- Botellas de cultivo celular de 25 y 75 cm² (Corning)
- Tubos cónicos de 15 y 50 mL (Corning)
- Crioviales de 1.5 mL (Corning)



- Placas de cultivo de 6 pozos (Corning)

5.2.3 PCR en tiempo real

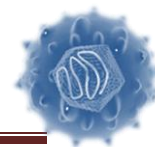
- Tira de 8 tubos Eppendorf MicroAmp (Applied Biosystems)
- Tapas ópticas para tubos MicroAmp (Applied Biosystems)
- Kimwipes (Kimtech Science)

5.2.4 Extracción de proteínas, SDS-PAGE y Western blot

- Raspador de goma (Corning)
- Placas de 96 pozos transparentes de fondo plano (Costar)
- Cámara de electroforesis vertical y para electrotransferencia en condiciones húmedas (Bio-Rad).

5.2.5 Material Biológico

- Línea celular HuH-7 Parental utilizada para la transfección con vector de expresión, pFK1, pNS5A y pE2, la cual se obtuvo del cepario del laboratorio de Infectología Molecular, resguardado a -80°C.
- Línea celular HepG2 utilizada para la transfección con vector de expresión, pFK1, pNS5A y pE2, la cual se obtuvo del cepario del laboratorio de Infectología Molecular, resguardado a -80°C.
- La cepa de *Escherichia coli* TOP10 utilizada para la transformación del vector de expresión, pFK1, pNS5A y pE2 se obtuvieron del cepario del laboratorio de Infectología Molecular, resguardado a -80°C.
- Plásmidos pFK1, pNS5A y pE2, los cual se obtuvieron del cepario del laboratorio de Infectología Molecular, resguardado a -80°C.



5.3 Equipos

5.3.1 Equipo de uso general

- Vórtex Genie 2
- Thermomixer (Eppendorf)
- Centrífuga refrigerada Biofuge primor (Heraeus)
- Centrífuga Centrifuge 54150 (Eppendorf)
- Centrífuga IECL30R (Thermo electron corporation)
- Fuente de poder, Power Pac1000 (Bio-Rad)
- Plancha con agitación (CIMAREC)
- Agitador mecánico (LabGenius)

5.3.2 Cultivo celular

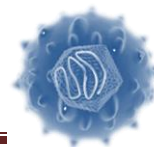
- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (Nuair)
- Incubadora de CO₂ (Nuair)
- Microscopio óptico invertido olympus CKX41
- Baño de agua Precision180
- Agitador mecánico (LabGenius)

5.3.3 Técnicas moleculares (RT-PCR, qPCR)

- Termociclador para PCR en tiempo real Real Time PCR system7500 (Applied Biosystems)
- Termociclador GeneAmp PCR system9700 (Applied Biosystems)
- Nanodrop 2000 (ThermoScientific)

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

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



CAPÍTULO VI

MÉTODOS

Metodología general

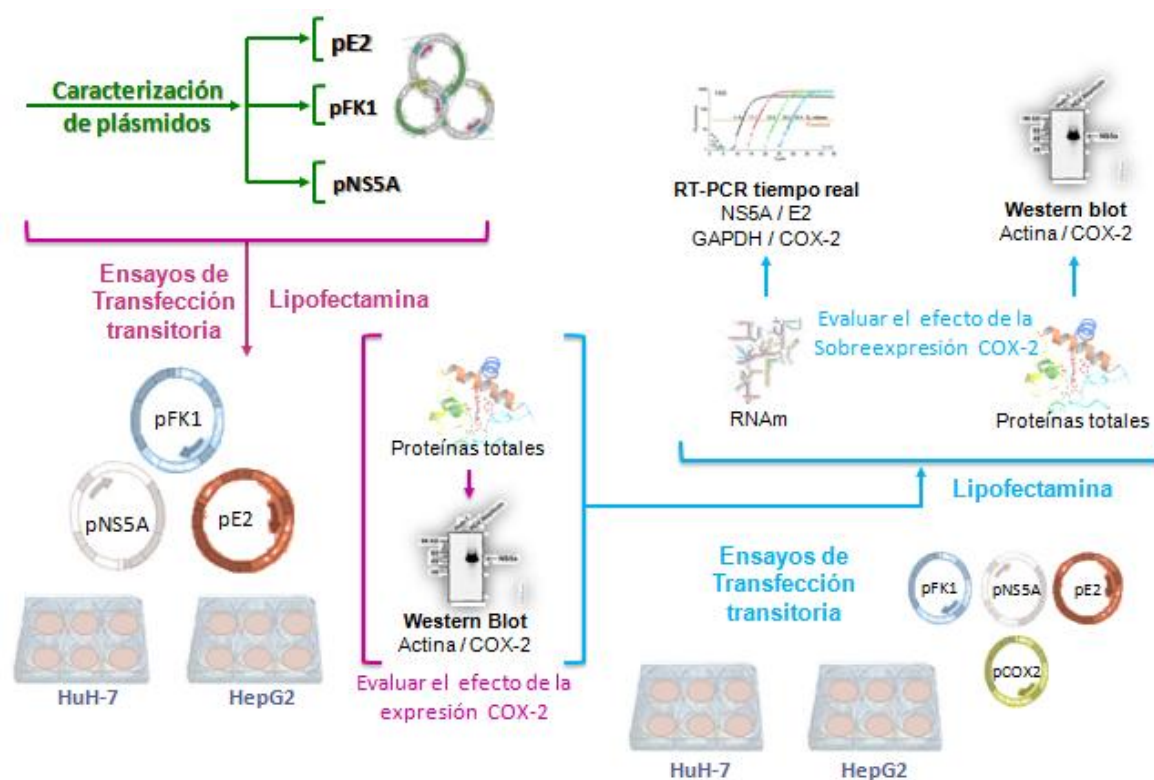
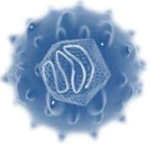


Fig. 10. Metodología general

Se utilizaron las líneas celulares HuH-7 y HepG2 para los ensayos de transfección transitoria, 2×10^5 células por pozo, por triplicado para cada condición experimental. Para la clonación de los plásmidos a transfectar se utilizó la cepa de *Escherichia coli* TOP 10.



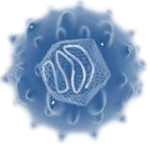
6.1 Preparación y transformación de células *E. coli* TOP 10 Ca-competentes

6.1.1 Preparación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl_2

1. Tomar 100 μL de bacterias *E. coli* TOP 10 congeladas y colocarlas en 100 mL de medio LB.
2. Incubar a 37 °C hasta en baño de agua con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm.
3. Dividir los 100 mL de medio + bacterias en un par de tubos falcon de 50 mL.
4. Centrifugar a 5000 rpm durante 3min a 4 °C.
5. Decantar al líquido y resuspender la pastilla en 1 mL de CaCl_2 0.1 M frío y posteriormente juntar ambas alícuotas.
6. Llevar a 30 mL con CaCl_2 0.1 M frío.
7. Incubar 30 min en hielo.
8. Centrifugar a 3000 rpm durante 5min a 4 °C.
9. Decantar el líquido y Resuspender la pastilla en 2 mL CaCl_2 0.1 M frío.

6.1.2 Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl_2 (Cohen et al., 1972)

1. Mezclar una cantidad determinada del plásmido a utilizar con 100 μL de bacterias Ca-Competentes. Hacer esto con sumo cuidado ya que las membranas de las bacterias se encuentran muy sensibilizadas. Subir y bajar suavemente con la puntilla.
2. Incubar en hielo 30 min. Por separado encender el termomixer y colocarlo a 42 °C.
3. Terminado el tiempo de incubación en hielo, colocar el tubo a 42 °C en el termomixer por 90 seg y sin agitación (shock térmico).
4. Regresar el tubo a hielo por 10 min.



5. Adicionar 100 μL de medio LB e incubar a 37 °C en termomixer, sin agitación por 1 h.
6. Dar spin a los tubos por 7 seg/13,000 rpm.
7. Retirar 120 μL del sobrenadante.
8. Resuspender la pastilla en el medio restante.
9. Sembrar todo el contenido del tubo en una placa con mediosólido Lb/amp 50 $\mu\text{g/mL}$.
10. Incubar la placa entre 12 y 16 h.
11. Sellar la caja con papel parafilm y almacenar a 4 °C hasta seleccionar las colonias.

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

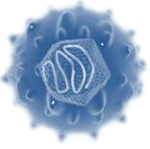
El ADN plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.* 2001).

Preparación de células

1. Inocular 10 mL de medio LB con antibiótico, con una colonia transformada de bacteria. Incubar toda la noche a 37°C con agitación vigorosa.
2. Transferir el cultivo a un tubo de 15 mL y recuperar las bacterias por centrifugación a 2000 g, por 10 min a 4 °C.
3. Remover el medio por aspiración, permitiendo que el pellet de bacteria se seque lo más posible.

Lisis celular

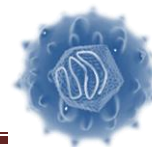
4. Resuspender el pellet en 200 μL de Solución de Lisis Alcalina I fría con vortex vigoroso, transferir la solución a un tubo de 2 mL.
5. Añadir 400 μL de Solución de Lisis Alcalina II recientemente preparada a cada suspensión de bacterias. Cerrar el tubo herméticamente y mezclar el contenido 5 veces por inversión rápida. No vortex. Almacenar el tubo en hielo.
6. Añadir 300 μL de Solución de Lisis Alcalina III fría. Cerrar el tubo y mezclar por inversión varias veces. Almacenar el tubo en hielo de 3-5min.



7. Centrifugar el lisado bacteriano a velocidad máxima por 5 min a 4°C en una microcentrífuga. Transferir 600 µL del sobrenadante a un tubo limpio.
8. Añadir igual volumen de fenol:cloroformo. Mezclar la fase orgánica con la acuosa por vortex y luego centrifugar la emulsión a velocidad máxima por 2 min a 4°C en una microcentrífuga. Transferir la fase acuosa que se encuentra por encima de la capa formada a un tubo limpio.

Recuperación del plásmido

9. Precipitar los ácidos nucleicos del sobrenadante por adición de 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar la solución en vortex e incubar 2 min a temperatura ambiente.
10. Recuperar el ácido nucleico precipitado por centrifugación a velocidad máxima por 5 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga.
11. Remover el sobrenadante por aspiración con micropipeta. Colocar el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel para permitir que los fluidos restantes se drenen. Remover las gotas adheridas a la pared del tubo.
12. Añadir 1 mL de Etanol al 70% al pellet y recuperar el ADN por centrifugación a máxima velocidad por 2 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga
13. Nuevamente remover el sobrenadante por aspiración con micropipeta
14. Remover cualquier residuo de etanol de las paredes del tubo. Almacenar el tubo abierto a temperatura ambiente hasta que el etanol se haya evaporado y no haya restos de ningún fluido visible en el tubo.
15. Disolver el ácido nucleicos en 100 µL de TE 1X pH 8 que contiene 20 µg/mL ARNsa libre de ADNsa. Mezclar en vortex unos segundos. Almacenar la solución a -20°C.



6.3 Caracterización de plásmidos, pFK1pNS5A y pE2

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

6.3.1 Caracterización del plásmido pFK1

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

6.3.2 Caracterización del plásmido pNS5A y pE2

Para confirmar la identidad de la secuencia clonada en el vector de expresión pNS5A y pE2, se llevó a cabo la caracterización con el corte con enzimas de restricción (*Ssp I*, *Hind III* y *Sfo I*), los patrones obtenidos fueron comparados con los esperados por los análisis *in silico* por predicción con base en sus secuencias.

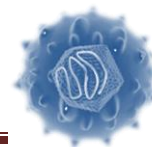
6.3.3 Purificación del ADN plasmídico a partir de gel de agarosa al 1%.

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

6.4 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizaron el programa Oligo versión 4.0, empleando como referencia la secuencia reportada el genoma completo del virus de la hepatitis C subtipo 1b gi|394933775|dbj|AB691953.1|.

Se diseñaron dos juegos de iniciadores, uno para la amplificación del gen NS5A y otro para la amplificación del gen E2.



6.5 Cultivo de células Hela

1. Partiendo de células en una botella de 25 cm² a un 90% de confluencia, retirar medio por aspiración.
2. Realizar un lavado con 2 mL de PBS 1 X (el volumen a utilizar depende del tamaño de botella que se emplea, ver anexos).
3. Desechar el PBS por aspiración, y adicionar 1 mL de tripsina 1x e incubar durante 10 min a 37°C, 5% de CO₂.
4. Agregar 1 mL de medio DMEM advanced con 2% SBF para inactivar la tripsina y pasar el contenido de la botella a un tubo cónico de 15 mL.
5. Centrifugar a 1,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Retirar el medio y resuspender con puntilla azul las células en 1 mL de medio nuevo (el volumen dependerá del tamaño del botón celular obtenido, ver anexos).
7. Colorar el volumen de células en cajas de 75 cm² de acuerdo a la cantidad que se desee expandir (para su posterior uso de producción de virus vaccinia (~4 cajas de 75 cm²).

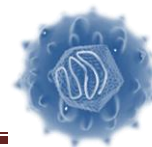
6.6 Ensayo de actividad biológica de *virus vaccinia*

El ensayo de actividad biológica del *virus vaccinia* sobre las células HuH-7 se describe en los anexos 6 y 7.

6.7 Cultivo de células HuH-7

6.7.1 Stock de células HuH-7 Parental

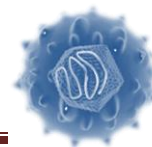
- A. Descongelar a temperatura ambiente un vial con células HuH-7 Parental almacenadas a -80 °C. (ver anexos)
- B. Adicionar todo el contenido del vial (1 mL) de células HuH-7 Parental a una botella de 25 cm² con 4 mL de medio DMEM advanced suplementado con 2% SBF, incubar a 37 °C y 5% CO₂.



- C. Cuando el cultivo celular alcanza un 90% de confluencia, hacer un subcultivo a una botella de 75 cm².
- D. Recuperar todas las células de la botella de 75 cm² utilizando tripsina 1x (para despegarlas de la base de la botella de cultivo). Realizar el conteo de células con azul tripano en cámara de Neubauer (ver anexos).

6.7.2 Subcultivo de células HuH-7 Parental

1. Partiendo de células en una botella de 25 cm² a un 90% de confluencia, retirar medio por aspiración.
2. Realizar un lavado con 2 mL de PBS 1 X (el volumen a utilizar depende del tamaño de botella que se emplea, ver anexos).
3. Desechar el PBS por aspiración, y adicionar 1 mL de tripsina 1x e incubar durante 10 min a 37°C, 5% de CO₂.
4. Agregar 1 mL de medio DMEM advanced con 2% SBF para inactivar la tripsina y pasar el contenido de la botella a un tubo cónico de 15 mL.
5. Centrifugar a 1,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Retirar el medio y resuspender con puntilla azul las células en 1 mL de medio nuevo (el volumen dependerá del tamaño del botón celular obtenido, ver anexos).
7. Conteo celular:
 - En un tubo Eppendorf de 0.6 mL, hacer una dilución 1:8 de células en medio de cultivo. Por lo tanto, adicionar 60 µL de medio más 10 µL de células.
 - Además, agregar 10 µL de azul de tripano al 0.4%, mezclar perfectamente y colocar 10 µL en cámara de Neubauer para contar.
 - Contar los cuatro cuadrantes de las esquinas. Sacar un promedio, y multiplicar de acuerdo a la siguiente fórmula:
$$\# \text{ de Células/mL} = \text{Promedio de células} \times 8 \text{ (factor de dilución)} \times 10,000$$
 - Ya con el número de células determinado, inocular las necesarias de acuerdo al experimento a realizar.

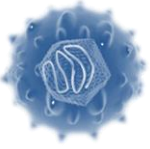


6.8 Cultivo de células HepG2

- A. Descongelar a temperatura ambiente un vial con células HuH-7 Parental almacenadas a -80°C . (ver anexos)
- B. Adicionar todo el contenido del vial (1 mL) de células HuH-7 Parental a una botella de 25 cm^2 con 4 mL de medio DMEM advanced suplementado con 2% SBF, incubar a 37°C y 5% CO_2 .
- C. Cuando el cultivo celular alcanza un 90% de confluencia, hacer un subcultivo a una botella de 75 cm^2 .
- D. Recuperar todas las células de la botella de 75 cm^2 utilizando tripsina 1x (para despegarlas de la base de la botella de cultivo). Realizar el conteo de células con azul tripano en cámara de Neubauer (ver anexos).

6.8.1 Subcultivo de células HepG2

1. Partiendo de células en una botella de 25 cm^2 a un 90% de confluencia, retirar medio por aspiración.
2. Realizar un lavado con 2 mL de PBS 1 X (el volumen a utilizar depende del tamaño de botella que se emplea, ver anexos).
3. Desechar el PBS por aspiración, y adicionar 1 mL de tripsina 1x e incubar durante 10 min a 37°C , 5% de CO_2 .
4. Agregar 1 mL de medio DMEM advanced con 2% SBF para inactivar la tripsina y pasar el contenido de la botella a un tubo cónico de 15 mL.
5. Centrifugar a 1,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Retirar el medio y resuspender con puntilla azul las células en 1 mL de medio nuevo (el volumen dependerá del tamaño del botón celular obtenido, ver anexos).
7. Conteo celular:
 - En un tubo Eppendorf de 0.6 mL, hacer una dilución 1:8 de células en medio de cultivo. Por lo tanto, adicionar 60 μL de medio más 10 μL de células.



- Además, agregar 10 μL de azul de tripano al 0.4%, mezclar perfectamente y colocar 10 μL en cámara de Neubauer para contar.
- Contar los cuatro cuadrantes de las esquinas. Sacar un promedio, y multiplicar de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

- Ya con el número de células determinado, inocular las necesarias de acuerdo al experimento a realizar

6.9 Ensayo de transfección transitoria

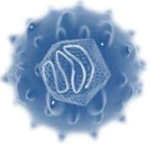
Día 1

1. Un día antes de la transfección sembrar 2×10^5 células (HuH-7 ó HepG2) en placas de 6 pozos (ó 50,000 células en placas de 24 pozos, si es que se realizará ensayos de transfección transitoria para extracción de ARN). De preferencia sembrar las células por la tarde.

Día 2

2. Observar que las células se encuentren en una confluencia entre 60-70%, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por 1.5 mL de medio ADMEM sin suero y sin antibiótico (en el caso de placas de 24 pozos, se adicionó 200 μL de medio).
3. Posteriormente, cada pozo de la placa fue infectado con 10 μL del stock de *virus vaccinia* recombinante. Es importante realizar previamente el ensayo de actividad biológica para definir el volumen necesario para infectar las células (ver anexo 6 y 7). (en el caso de placas de 24 pozos, se adicionó 2.5 μL de *virus vaccinia*)
4. En seguida las células fueron incubadas durante 1 hora. Mientras transcurría el tiempo de la infección se prepararon las mezclas de transfección como se describe en la figura 11.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



Transfección transitoria . Lipofectamina 2000.

Siembra en caja de 6 pozos

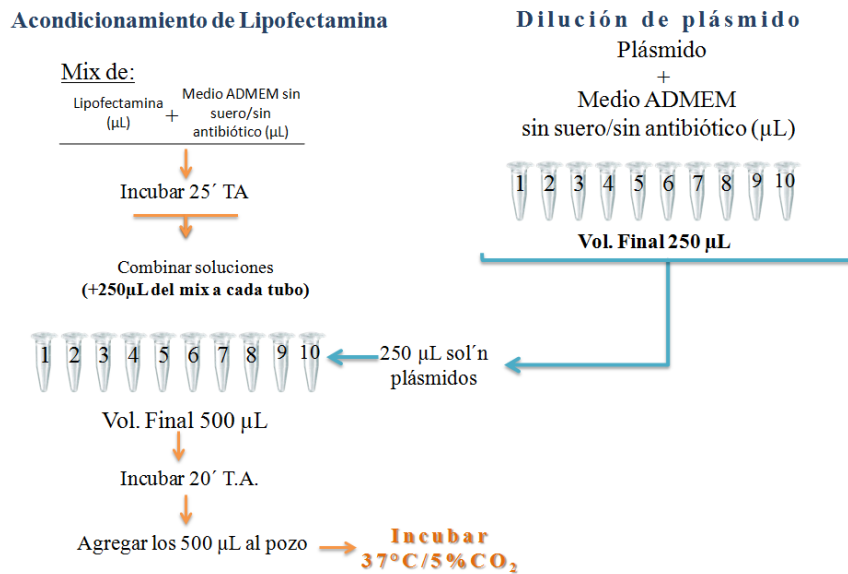


Fig. 11 Esquema que muestra la manera de llevar a cabo el ensayo de Transfección transitoria con Lipofetamina 2000

Tabla 4. Cantidad de reactivos a utilizar. Experimento en cajas de 6 pozos para extracción de proteínas totales. (Ensayo de transfección, objetivo 2) Se estableció el uso de 2 cantidades de plásmido (pFK1/ pNS5A/ pE2) y a 3 distintos tiempos post-transfección para determinar cuál era el tiempo en donde había una mayor expresión de COX-2 y así planear los experimentos de co-transfección.

N= pFK1/ pNS5A/ pE2						
Relación DNA:Lipofectamina						
1:1						
	Numero de pozo	Vaccinia virus (μL)	Lipofectamina (μL)	N (μg)	pcDNA (μg)	Cantidad Total de DNA
control de plásmido vacío pcDNA	1	10	1	x	1	1
control de lipofectamina	2	x	1	x	x	0
0 h	3	10	1	0.5	0.5	1
	4	10	1	1	0	1
24 h	5	10	1	0.5	0.5	1
	6	10	1	1	0	1
36 h	7	10	1	0.5	0.5	1
	8	10	1	1	0	1
48 h	9	10	1	0.5	0.5	1
	10	10	1	1	0	1

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2

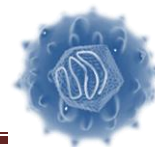
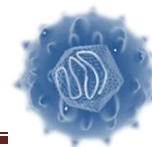


Tabla 5. Cantidad de reactivos a utilizar. Experimento en cajas de 6 pozos para extracción de proteínas totales a 36h (co-transfección. Objetivo 3). Ya con el tiempo de mayor expresión de COX-2 (36h) se determinaron las cantidades de plásmido (pFK1/ pNS5A/ pE2/pCOX-2) a utilizar para determinar el efecto de la expresión de proteínas virales sobre COX-2; así como la sobreexpresión de COX-2 sobre el ARN viral.

N= pFK1/ pNS5A/ pE2							
Relación DNA:Lipofectamina 1:1							
	No. de tubo	Vaccinia virus (μL)	Lipofectamina (μL)	plásmido N (μg)	plásmido pCOX2 (μg)	pcDNA (μg)	cantidad total de DNA (μg)
Ctrl plásmido vacío	1	10	0.7	\	\	0.5	0.5
36h	2	10	0.7	0.2	\	0.3	0.5
	3	10	0.7	0.5	\	x	0.5
	4	10	0.7	\	0.1	0.4	0.5
	5	10	0.7	\	0.5	\	0.5
	6	10	0.7	0.2	0.1	0.2	0.5
	7	10	0.7	0.2	0.5	\	0.7
	8	10	0.7	0.5	0.1	\	0.6
	9	10	1	0.5	0.5	\	1

Tabla 6. Cantidad de reactivos a utilizar. Experimento en cajas de 24 pozos para extracción de ARN total a 36h (co-transfección. Objetivo 3). Ya con el tiempo de mayor expresión de COX-2 (36h) se determinaron las cantidades de plásmido (pFK1/ pNS5A/ pE2/pCOX-2) a utilizar para determinar el efecto de la expresión de proteínas virales sobre COX-2; así como la sobreexpresión de COX-2 sobre el ARN viral.

N= pFK1/ pNS5A/ pE2							
Relación DNA:Lipofectamina 1:1							
	No. de tubo	Vaccinia virus (μL)	Lipofectamina (μL)	plásmido N (μg)	plásmido pCOX2 (μg)	pcDNA (μg)	cantidad total de DNA (μg)
Ctrl plásmido vacío	1	2.5	0.7	\	\	0.5	0.5
36h	2	2.5	0.7	0.2	\	0.3	0.5
	3	2.5	0.7	0.5	\	x	0.5
	4	2.5	0.7	\	0.1	0.4	0.5
	5	2.5	0.7	\	0.5	\	0.5
	6	2.5	0.7	0.2	0.1	0.2	0.5
	7	2.5	0.7	0.2	0.5	\	0.7
	8	2.5	0.7	0.5	0.1	\	0.6

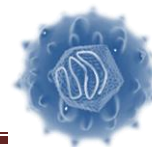


	9	2.5	1	0.5	0.5	\	1
--	---	-----	---	-----	-----	---	---

5. Después de los 20 min necesarios para la formación de los complejos, se sacaron las placas de la incubadora, y se colocó en cada pozo la mezcla de transfección (500 μ L) correspondiente. Se recomienda colocar el volumen de la mezcla de transfección en 2 pasos y mezclar suavemente.
6. Se regresaron las placas a la incubadora y se dejaron ahí hasta el momento de llevar a cabo los experimentos al tiempo establecido (T 0, 24 h, 36 h o 48h).
7. Las células fueron observadas al microscopio a las 24 h, 36 h y 48 h. Al término de cada uno de los tiempos establecidos post-transfección se realizó la extracción de proteínas totales necesarias para los ensayos de Western blot y ARN total para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

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

1. Remover mediante aspiración el medio de cultivo de cada pozo sin hacer lavado con PBS.
2. Fase de Homogenización:
 - Adicionar 200 μ L de TRIzol a cada pozo de la caja de 24 pozos, para lisar las células, realizar esto a 4 °C.
3. Fase de separación:
 - Incubar durante 5 min a TA y después transferir la mezcla de TRIzol a un tubo Eppendorf de 2 mL.
 - Adicionar 40 μ L de cloroformo frío por cada 200 μ L de TRIzol empleados, en éste caso 120 μ L en total, ya que se realizó por triplicado. Mezclar por inversión durante 15 seg.
 - Incubar el tubo en hielo de 2 a 3 min.
 - Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C.
4. Fase de precipitación:



- Recuperar sólo la fase acuosa y adicionarle 300 μL de isopropanol.
 - Incubar toda la noche o 1 hora a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Fase de lavado:
- Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 600 μL de etanol al 70% y mezclar con vórtex.
 - Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Fase de resuspensión:
- Retirar el etanol sin tocar la pastilla. Dar un spin a TA y para eliminar los restos de etanol en el tubo, utilizar una puntilla de 10 μL .
 - Resuspender la pastilla en 11.7 μL de agua DEPC con 0.3 μL de RNase OUT (inhibidor de ARNsas), como se realizó el experimento por triplicado se resuspendió el ARN de cada tubo en un volumen de 36 μL .

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

- 1 En un tubo Eppendorf de 0.6 mL mezclar los siguientes reactivos (1x):

TABLA 7
Reactivos mezcla 1 para RT-PCR MMLV

Reactivos	Volumen
Random primer	1 μL
ARN [x]	5 μL
Agua DEPC	cbp 11.5 μL
Vol. Final	11.5 μL

- 2 Incubar 10 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ en termociclador.
- 3 Pausar el termociclador, enfriar tubos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en hielo 3 minutos (No exceder tiempo)
- 4 Agregar 8.5 μL de la mezcla 2 (1X)

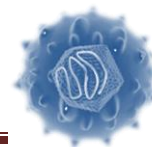


TABLA 8
Reactivos mezcla 2 para RT-PCR MMLV

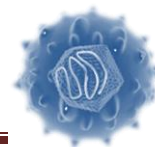
Reactivos	Volumen
Buffer 5x	4 μ L
DTT	2 μ L
RNase out	0.5 μ L
DNTP's	1 μ L
MMLV	1 μ L
Volumen Final	8.5 μ L

- 5 Programar termociclador con las siguientes condiciones:

TABLA 9
Condiciones de RT-PCR

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

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



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

6.12.1 Replicón completo pFK1₃₈₉-NS3-3' y GAPDH

Uso de Sonda Taqman

Para la cuantificación relativa de los niveles de ARN viral se amplificó bajo las mismas condiciones el gen GAPDH.

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

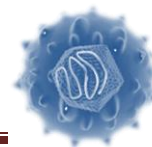
TABLA 10. Reactivos: Mix para qPCR
Amplificación: ARN de 5'UTR-NS5B (VHC) y ARN de GAPDH (Endógeno)

Reactivos	Volumen
Master mix 2X	10 µL
Agua DEPC estéril	cbp 20 µL
Ensayo* Δ 20x	1 µL
cDNA**	50 ng/rx
Vol. Final	20 µL

*Ensayo VHC: Contiene los iniciadores y la sonda fluorescente; la sonda tiene como reportero el fluoróforo **FAM** y como inhibidor NFQ-MGB. Debido a que es sensible a la luz, se debe trabajar en oscuridad.

Δ Ensayo GAPDH: Contiene los iniciadores y la sonda fluorescente; la sonda tiene como reportero el fluoróforo **VIC** y como inhibidor NFQ-MGB. Debido a que es sensible a la luz, se debe trabajar en oscuridad.

2. Después en tubos para qPCR (0.2 mL) adicionar la mezcla anterior y por último el volumen de cDNA para tener 50 ng en cada tubo**. El blanco será un tubo que en



lugar de cDNA se le adiciona Agua milliQ. El volumen final será de 20 μ L por tubo.

3. Programar termociclador con las siguientes condiciones:

TABLA 11. Condiciones generales para qPCR

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

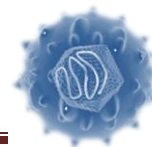
6.12.2 GEN NS5A; Gen E2

Uso de Sybr green

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

**TABLA 12.
Reactivos para qPCR del gen NS5A y E2**

Reactivos	Volumen
Sybr GreenER qPCR SuperMix 2 X	10 μ L
Forward 10 μ M	0.4 μ L
Reverse 10 μ M	0.4 μ L
Agua DEPC estéril	cbp 20 μ L
cDNA	250 ng/rx (10 μ L)
Vol. Final	20 μ L



- Después en tubos para qPCR (0.2 mL) adicionar la mezcla anterior y por último el volumen de cDNA para tener 250ng en cada tubo. El blanco será un tubo que en lugar de cDNA se le adiciona Agua milliQ. El volumen final será de 20 μ L por tubo.
- Programar termociclador con las mismas condiciones antes mencionadas para qPCR de VHC-ARN. Sólo indicar en el programa que se usa Syber Green y se debe obtener también la curva de disociación.

6.12.3 Gen COX-2

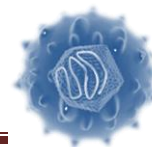
Uso de Sybr green

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

TABLA 13. Reactivos para qPCR del gen COX-2

Reactivos	Volumen
Sybr GreenER qPCR SuperMix 2 X	10 μ L
Forward 5 μ M	0.8 μ L
Reverse 5 μ M	0.8 μ L
Agua DEPC estéril	cbp 20 μ L
cDNA	250 ng/rx (10 μ L)
Vol. Final	20 μ L

- Después en tubos para qPCR (0.2 mL) adicionar la mezcla anterior y por último el volumen de cDNA para tener 250ng en cada tubo. El blanco será un tubo que en lugar de cDNA se le adiciona Agua milliQ. El volumen final será de 20 μ L por tubo.



3. Programar termociclador con las mismas condiciones antes mencionadas para qPCR de VHC-ARN. Sólo indicar en el programa que se usa Syber Green y se debe obtener también la curva de disociación.

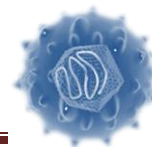
6.13 Extracción y cuantificación de proteínas totales

6.13.1 Extracción de proteínas totales

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

Retirar todo el medio con micropipeta y colocar la placa sobre hielo.

1. Añadir 200 μ L de la solución de raspado (PBS 1X/EDTA 1mM)
2. Con un raspador de goma (scraper) realizar el raspado de arriba hacia abajo aplicando presión sólo en una dirección (al regresar el raspador, no raspar de abajo hacia arriba), por último, raspar las orillas de la caja (rotar la caja de 3-4 veces 90°).
3. Repetir el proceso girando 90°.
4. Con una micropipeta tomar la suspensión de células y colocarla en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, dejar el tubo en hielo.
5. Añadir 100 μ L de la solución de raspado para realizar el último raspado del pozo.
6. Pasar la suspensión al tubo del paso 5. Dar 2 spin a 14,000 rpm. Desechar todo el sobrenadante con micropipeta. Dar otro spin y retirar el sobrenadante que queda en las paredes del tubo.



7. Agregar entre 40-50 μL de Buffer de lisis para triplicados de las cajas de 6 pozos (según el pellet obtenido) y mezclar por inversión (vórtex hasta disolver la pastilla de células).
8. Incubar en hielo durante 20 minutos.
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos a 4 °C.
10. Retirar el sobrenadante y pasarlo a un tubo nuevo (en el sobrenadante es donde se encuentran las proteínas).
11. Almacenar a -20 °C.

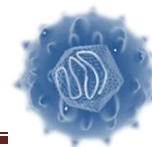
6.13.2 Cuantificación de proteínas por Método de Bradford

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

6.14 SDS-PAGE y electrotransferencia en condiciones húmedas

6.14.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

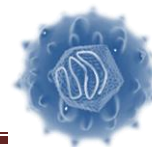
1. Preparar mini geles de poliacrilamida al 12% de un grosor de 1mm (ver anexos).



2. Depositar en cada pozo del gel 50 μg de proteína con $\frac{1}{4}$ de volumen de buffer de carga 4X.
3. Correr el gel a 80 V alrededor de 3 h para la adecuada separación de las proteínas.

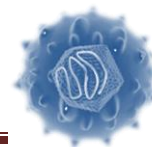
6.14.2 Electrotransferencia en condiciones húmedas

1. Recortar la membrana Hybond-P PVDF (Amerf Bioscience) con dimensiones 6 cm ancho x 8 cm de largo.
2. Sumergir la membrana en Metanol al 100% por 10 seg.
3. Lavar la membrana con agua milliQ 5 min y equilibrar la membrana con buffer de transferencia por 10 min. Humedecer 4 piezas de papel filtro y 2 esponjas en buffer de transferencia.
4. Retira el gel de la cámara de electroforesis y descartar el gel concentrador.
5. Colocar sobre el gel una pieza de papel filtro, después la membrana activada sobre el gel y colocar sobre ésta 2 piezas de papel filtro.
6. Colocar en forma de sándwich de tal forma que la membrana quede de cara al lado claro (Ver anexos).
7. Realizar la transferencia a 4 °C durante 1 h a 100 V en agitación.
8. Lavar la membrana con PBS 1x adicionado con 0.5% de Tritón X-100 durante 5 minutos.
9. Teñir la membrana con el colorante Rojo de Ponceau por 1 min, y después realizar lavados con PBS 1X - 0.5% de Tritón X-100, para comprobar la transferencia de las proteínas a la membrana, así como visualizar si hubo formación de burbujas al momento de la transferencia.



6.15 Ensayo de Western blot

1. Incubar la membrana con las proteínas en buffer de bloqueo a 4 °C durante toda la noche en agitación.
2. Lavar la membrana 3 veces con PBS 1X 0.5% de Tritón X-100 durante 5 minutos por cada lavado, a temperatura ambiente en agitación.
3. Incubar la membrana con el Anticuerpo primario (IgG de conejo anti-COX2, IgG de ratón anti-ACTINA) durante 2 horas a 4 °C en agitación.
4. Lavar la membrana 3 veces con PBS 1X 0.5% de Tritón X-100 durante 5 minutos por cada lavado a TA en agitación.
5. Incubar la membrana con el Anticuerpo secundario (Anti IgG de conejo conjugado con HRP ó Anti IgG de ratón conjugado con HRP) durante 2 horas a 4 °C en agitación.
6. Lavar la membrana 3 veces con PBS 1X 0.5% de Tritón X-100 durante 10 minutos por cada lavado a TA en agitación.
7. Proceder al ensayo de quimioluminiscencia (ECL: Enhanced Chemiluminescence):
 - Secar el excedente de PBS y humedecer la membrana en la soluciones de luminol para revelar.
 - Mezclar durante 2 min con la solución de luminol y revelar en el ChemiDoc™ (Bio-Rad).



Capítulo VII. RESULTADOS

7.1 Preparación y transformación de células *E. coli* TOP 10 Ca-competentes

7.1.1 Preparación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl_2

Se prepararon células *E. coli* TOP10, las cuales tardaron un poco en crecer, pudiendo deberse a que llevaban mucho tiempo almacenadas, después de su crecimiento y preparación a Ca-competentes se almacenaron alícuotas de bacterias en CaCl_2 + glicerol 15%, y se llevaron a -80°C para su posterior uso.

7.2 Transformación de células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl_2 (Cohen et al., 1972)

A partir de las colonias crecidas en medio LB-ampicilina (50 mg/mL), se almacenó una alícuota con glicerina al 15%, a fin de convertirlas en fuente renovable del plásmido de interés, mezclando 850 μL del medio de cultivo y 150 μL de glicerol anhidro estéril y congelando a -80°C . En la figura 13 se muestra esquematizado los pasos del método descrito por Sambrook.

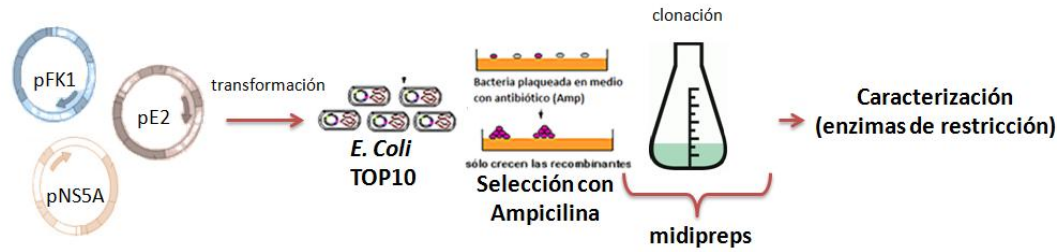
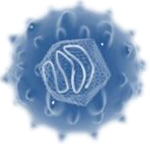
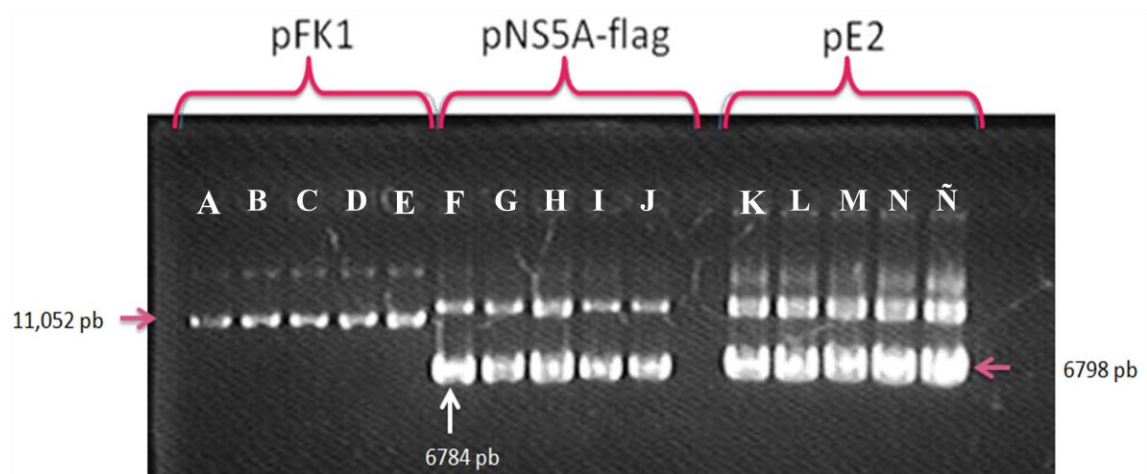


Fig.12. Esquema de extracción de plásmidos utilizados. Se resumen los pasos a seguir descritos por Sambrook para la extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina

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

Se llevó a cabo la extracción plasmídica por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2001) según se indica en metodología, sección 6.2. El producto obtenido se muestra en la Figura 16, en la cual se puede apreciar la integridad de los plásmidos obtenidos.

En la Figura 14 se muestra el producto de la extracción realizada, donde por el patrón de migración electroforética se confirmó el éxito de la extracción, se realizó la extracción de ADN plasmídico de 5 clonas diferentes, se observan 2 bandas en cada carril debido al estado laxo y superenrollado de los plásmidos.



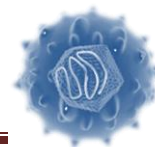


Fig.13. Extracción de los plásmidos pFK1 (A-E), pNS5A (F-J) y pE2 (K-Ñ). Se aprecia la integridad de los plásmidos extraídos. Con flechas se señala el peso molecular de cada uno. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

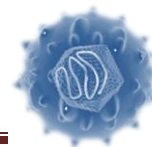
7.4 Caracterización de plásmidos pFK1, pNS5A y pE2

A fin de comprobar que teníamos los plásmidos de interés, se realizó una caracterización mediante enzimas de restricción, empleando EcoRI, HindIII, SfoI SfiI y SspI, buscando que tuvieran sitios dentro del vector así como en la secuencia insertada. De esta manera se determinó la presencia del inserto de interés dentro de cada uno de los vectores utilizados, el resultado se muestra en las Figuras 15, 16 y 17, donde se indica la obtención de la banda esperada al cortar con la enzima que se indica.

En la tabla 10 se muestran las enzimas utilizadas para cada uno de los plásmidos analizados junto con el fragmento que se espera obtener para cada uno.

Tabla 14. Fragmentos obtenidos como parte de la caracterización de plásmidos con enzimas de restricción

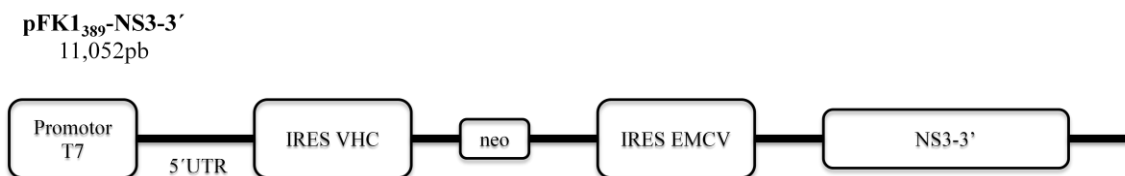
ENZIMAS	pFK1	pNS5A	pE2
Hind III	1463 pb	5428 pb 2260 pb	5424 pb 2260 pb
EcoRI	1854 pb	-----	-----
SfiI	5933 pb 3077 pb	-----	-----



SfoI	-----	848 pb 904 pb	1370 pb
SspI	-----	1356 pb	1920 pb

7.4.1 Caracterización del plásmido pFK1

Se seleccionaron 5 clonas de cada uno de los plásmidos.



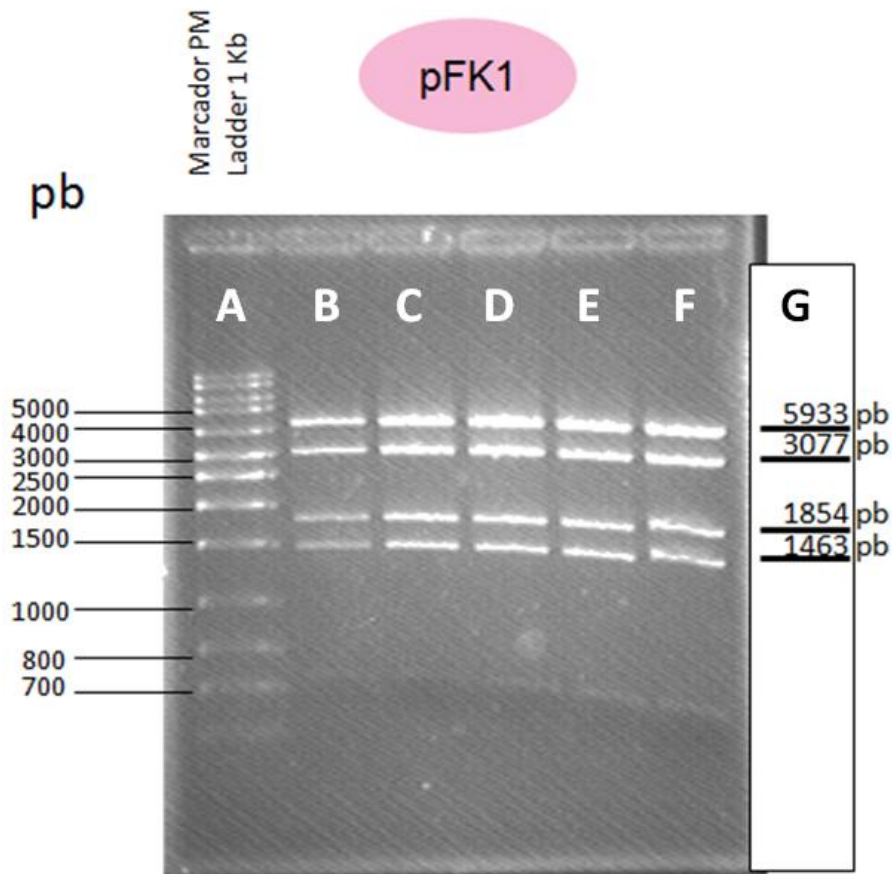
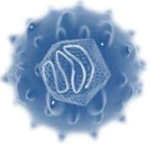
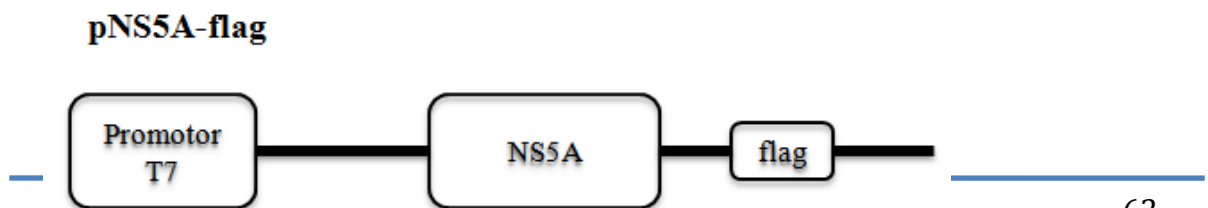


Figura 14. Análisis mediante enzimas de restricción del plásmido pFK1₃₈₉-NS3-3'. A la derecha (G) se muestran los patrones predichos para la secuencia del plásmido, a la izquierda la confirmación experimental de los patrones (B, C, D, E y F). Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En la parte superior de la figura se muestra una representación esquemática del plásmido analizado.

7.4.2 Caracterización del plásmido pNS5A y pE2

Plásmido pNS5A-flag



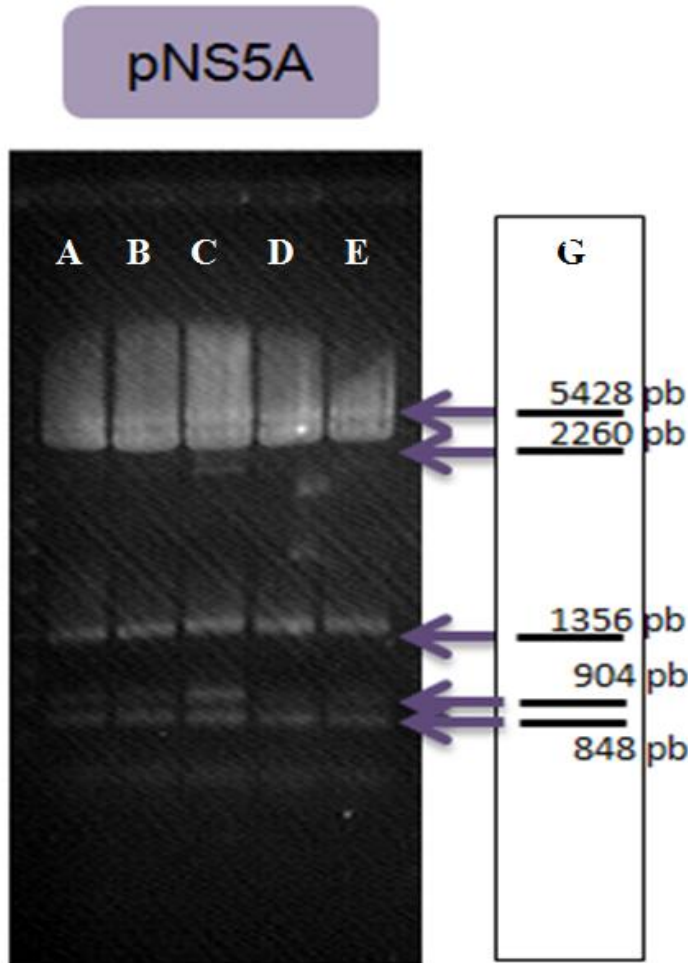
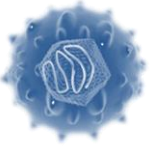


Figura 15. Análisis mediante enzimas de restricción del plásmido pNS5A-FLAG. A la derecha (G) se muestran los patrones predichos para la secuencia del plásmido, a la izquierda la confirmación experimental de los patrones (A, B, C, D y E). Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En la parte superior de la figura se muestra una representación esquemática del plásmido analizado

Plásmido pE2



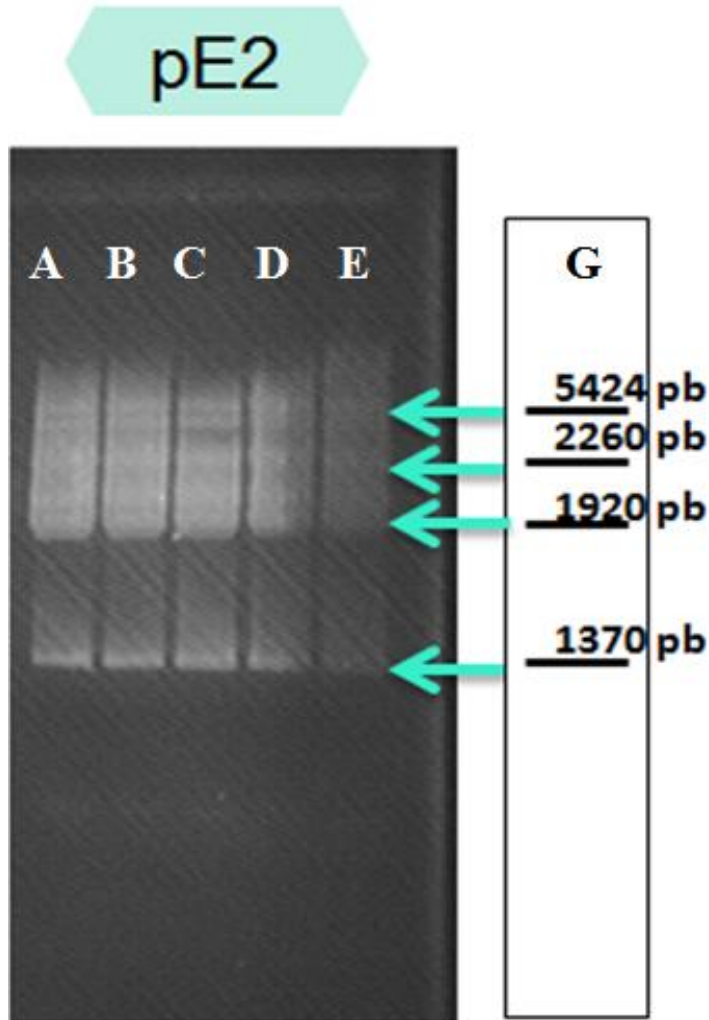
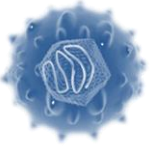
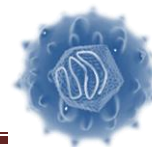


Figura 16. Análisis mediante enzimas de restricción del plásmido pE2. A la derecha (G) se muestran los patrones predichos para la secuencia del plásmido, a la izquierda la confirmación experimental de los patrones (B, C, D, E y F). Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En la parte superior de la figura se muestra una representación esquemática del plásmido analizado.

7.5 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia codificante

Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos basándonos en secuencia del genoma completo de ARN del VHC con el siguiente número de identificación del Gen Bank: [gi/394933775/dbj/AB691953.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi/394933775/dbj/AB691953.1) *Hepatitis C virus subtype 1b genomic ARN, complete genome, strain: NCI*. Como se mostró en las tablas 2 y 3 anteriormente

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



mostradas las secuencias de las regiones que codifican para las proteínas virales NS5A y E2.

TABLA.2. Oligonucleótidos para amplificar gen NS5A de VHC genotipo 1b

Oligonucleótidos	Secuencia	Posición
Forward	5'- AACCATGACTCCCCAGAC-3'	736
Reverse	5'- CCATCTCCTGCCGCCACA-3'	779

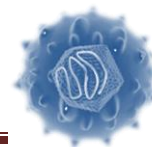
Producto amplificado= 61 pb del gen NS5A

Optimal Annealing Temperature: 53.5° (Max: 67.1°)

	Position and Length		T _m [°C]	GC [%]	P.E.#
Product	61		84.7	62.3	-----
Upper Primer	736	18	64.1	55.6	403/403
Lower Primer	779	18	75.5	66.7	495/495

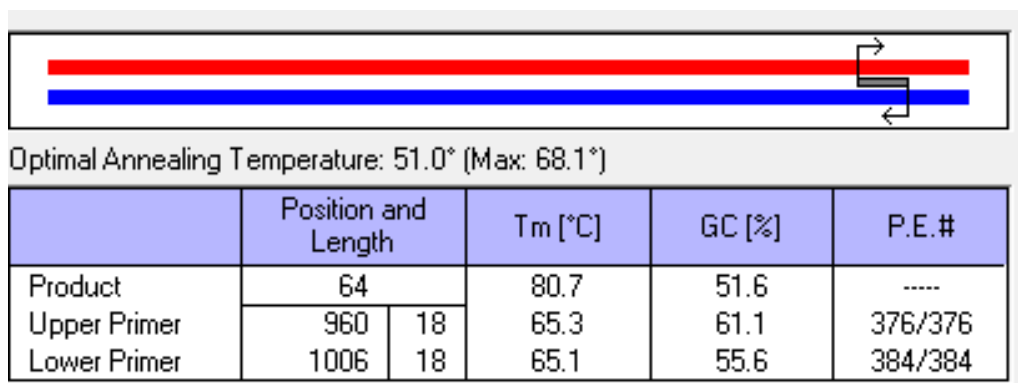
TABLA.3 Oligonucleótidos para amplificar gen E2 de VHC genotipo 1b

Oligonucleótidos	Secuencia	Posición
Forward	5'- CGGTGTAGGGTCAGTGGT-3'	960



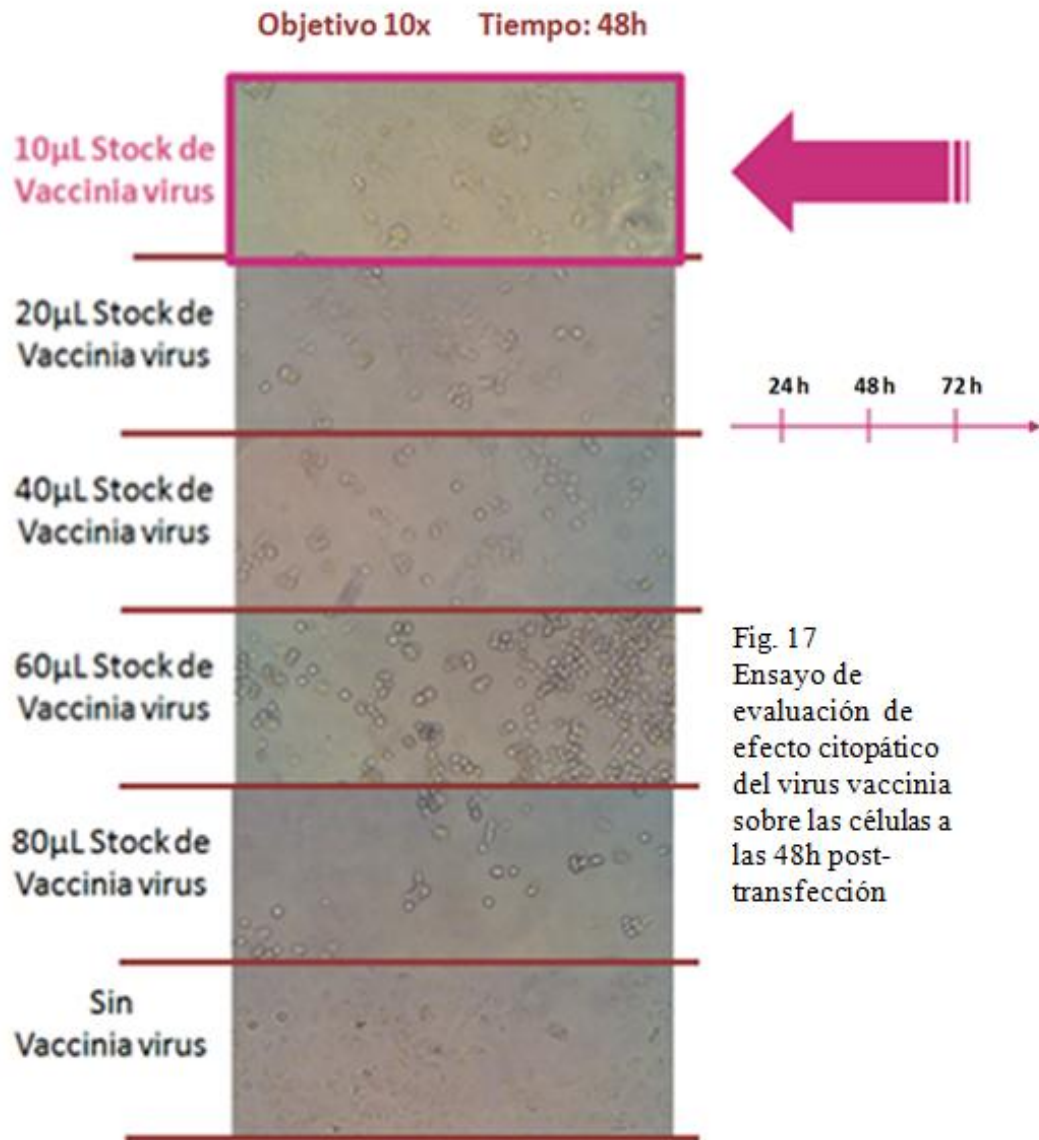
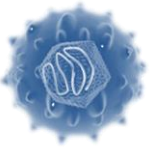
Reverse	5'- AAGGAAGAGCAGCACGAC-3'	1006
----------------	---------------------------	-------------

Producto amplificado= 64 pb del gen E2



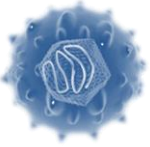
7.6 Ensayo de actividad biológica de *virus vaccinia*

Se llevó a cabo el ensayo de actividad biológica para definir el volumen necesario a utilizar de virus *Vaccinia* para infectar las células HuH-7 y HepG2 en los ensayos de transfección. Se utilizaron las células HuH-7 parentales para este ensayo. En la Fig. 18 Se muestra el ensayo de evaluación de efecto citopático del virus vaccinia sobre las células HuH-7 a las 48h. Cabe señalar que la evaluación del efecto citopático se llevó a cabo a los tiempos 24, 48 y 72 h Sin embargo solo se muestran las 48 h ya que los posteriores ensayos de transfección transitoria tienen como tiempo máximo 48h.



Objetivo 2. Evaluar los niveles de COX-2 en las líneas celulares HuH-7 y HepG2 en presencia de las proteínas de VHC.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



Para evaluar el efecto de la presencia de proteínas virales sobre la COX-2 endógena de las células HuH-7 y HepG2, éstas fueron infectadas con el virus vaccinia recombinante por 1 hora, seguido de una transfección transitoria con plásmidos que expresan las proteínas virales, cada uno a 2 cantidades (0.5 μg y 1 μg), la expresión de éstos plásmidos se encuentra dirigido bajo el control del promotor de la T7 ARN polimerasa. Al término de cada tiempo (0, 24, 36 y 48h post-transfección) las células fueron cosechadas y se extrajeron las proteínas totales que fueron sujetas a Western blot las cuales fueron cuantificadas por el método de Bradford; por otro lado, en otro ensayo de transfección transitoria, las células transfectadas fueron lisadas para la extracción de ARN por el método de TRIzol[®]. Para los ensayos de Western blot se utilizó la proteína actina para normalizar los ensayos de transfección.

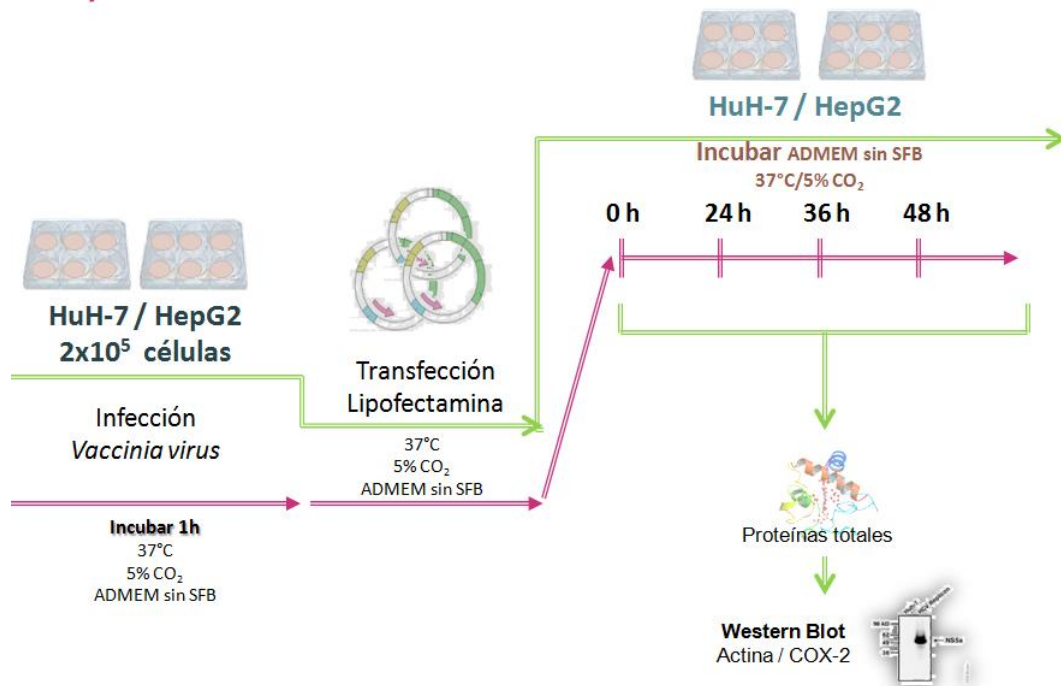
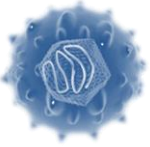


Fig. 18. Esquema de transfección transitoria. Se utilizaron 2×10^5 células por pozo, las cuales fueron infectadas con *vaccinia virus* para expresar la polimerasa T7, después de 1 h de infección se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas virales (pFK1, pNS5A y pE2) cada uno de manera individual, que están bajo el control del promotor T7 Polimerasa. Se extrajeron proteínas a las 0, 24, 36 y 48 h post-transfección.

7.7 Transfección transitoria de células HuH-7 con pFK1. Expresión de proteínas no-estructurales del VHC.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



De acuerdo al análisis densitométrico, realizado con el programa ImageJ, se observó que en presencia de proteínas virales, el nivel de proteína COX-2 se incrementó con el paso del tiempo hasta las 36h, alrededor de 5-7 veces con respecto al control (pcDNA, plásmido vacío), a las 48h el nivel de proteína COX-2 se vio disminuido, sin embargo aun esta incrementado 5 veces con respecto al control. Esto sugiere que las proteínas virales tienen un efecto sobre la vía de activación de la expresión de la proteína endógena COX-2.

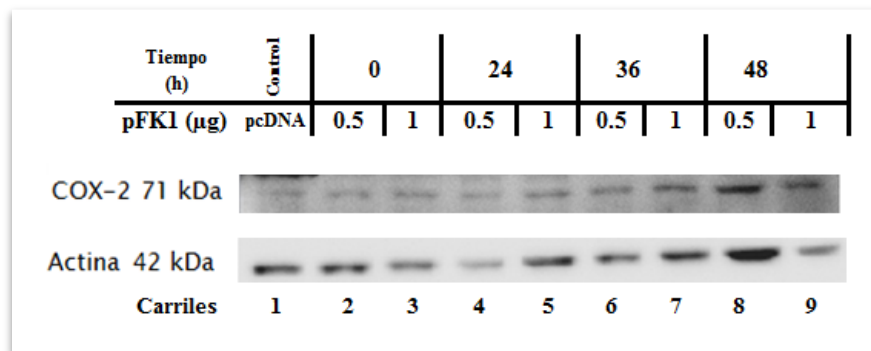
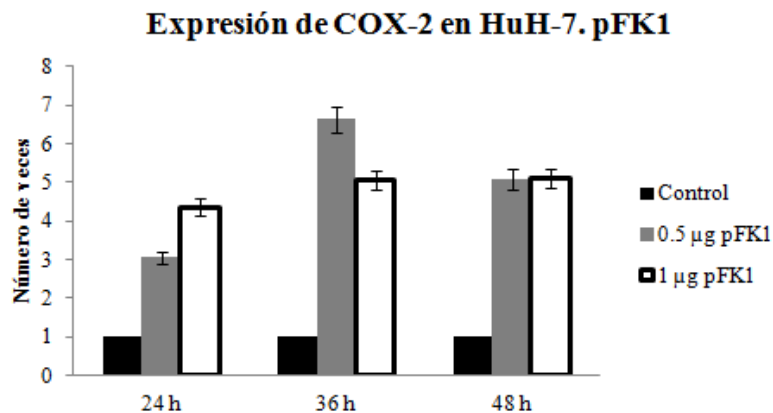
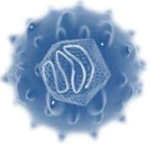


Fig. 19. Efecto de la expresión de proteínas virales sobre la expresión de COX-2 en células HuH-7 transfectadas con pFK1. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pFK1 que expresa las proteínas no-estructurales del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos 0, 24, 36 y 48h.

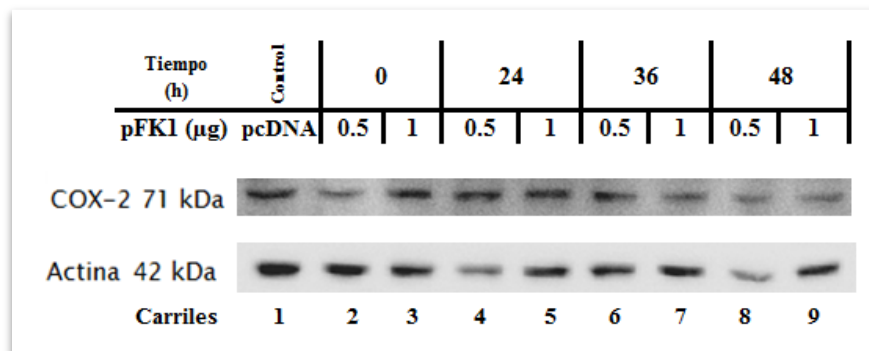




Gráfica 1. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HuH-7 transfectadas con el plásmido pFK1. Se comparan las células transfectadas con pFK1 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA a las cuales se les asignó el valor de 1.

7.8 Transfección transitoria de células HepG2 con pFK1. Expresión de proteínas no-estructurales del VHC.

Se realizó Western blot para identificar la proteína COX-2 y el análisis densitométrico mostró que en presencia de 1 μg pFK1, el nivel de proteína COX-2 se incrementó con el paso del tiempo hasta las 36h, alrededor de 3 veces con respecto al control (pcDNA, plásmido vacío), a las 48h el nivel de proteína COX-2 se vio disminuido, sin embargo cuando se utilizó 0.5 μg pFK1 hubo una disminución a las 36h y aumentó hacia las 48 h. Esto sugiere que, en comparación con la línea celular HuH-7, en HepG2 el efecto de las proteínas no estructurales sobre el incremento de COX-2 no es tan evidente.



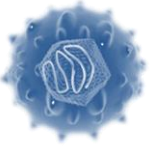
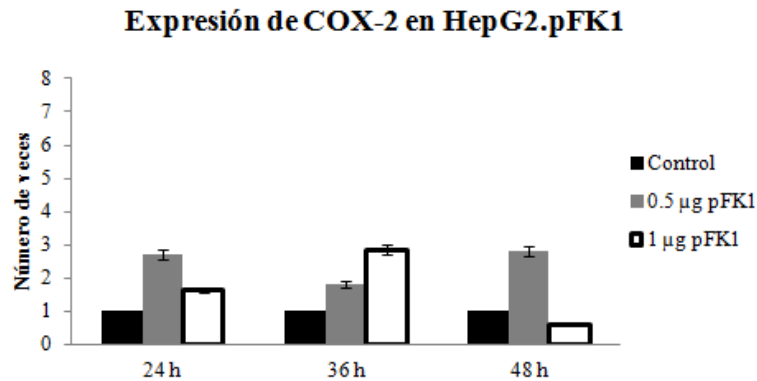


Fig. 20 Efecto de la expresión de proteínas virales sobre la expresión de COX-2 en células HepG2 transfectadas con pFK1. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pFK1 que expresa las proteínas no-estructurales del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos 0, 24, 36 y 48h.

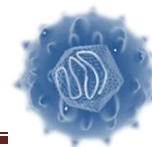


Gráfica 2. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HepG2 transfectadas con el plásmido pFK1. Se comparan las células transfectadas con pFK1 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA a las cuales se les asignó el valor de 1.

7.9 Transfección transitoria de células HuH-7 con pNS5A. Expresión de proteína no-estructural NS5A del VHC.

De acuerdo al análisis densitométrico, realizado con el programa ImageJ, se observó que en presencia de 0.5 µg pNS5A, el nivel de proteína COX-2 se incrementó hasta las 36h alrededor de 6 veces con respecto al control (pcDNA, plásmido vacío), a las 48h el nivel de proteína COX-2 se vio disminuido a 2 veces; en comparación con el incremento de COX-2 cuando se utilizó 1µg pNS5A en donde se presentó solamente el doble de proteína con respecto al control a las 24, 36 y 48 h, lo que se puede deber a que haya una saturación en el

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



RE que inhiba la traducción de COX-2 y de proteínas en general. Esto sugiere que la proteína viral tiene un efecto sobre la vía de activación de la expresión de la proteína endógena COX-2.

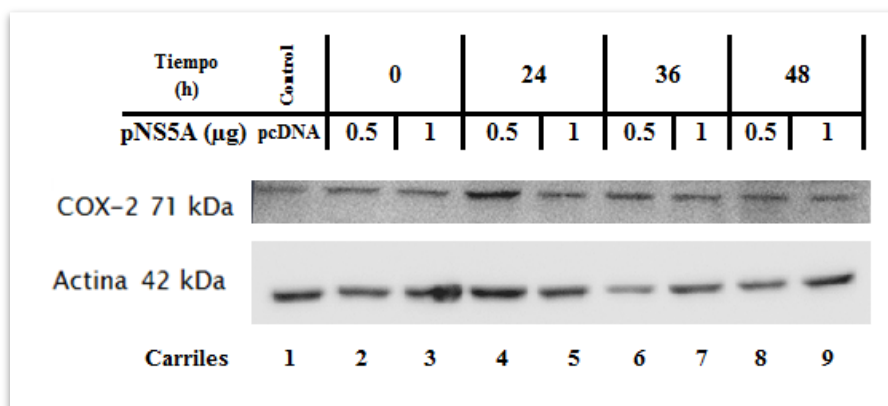
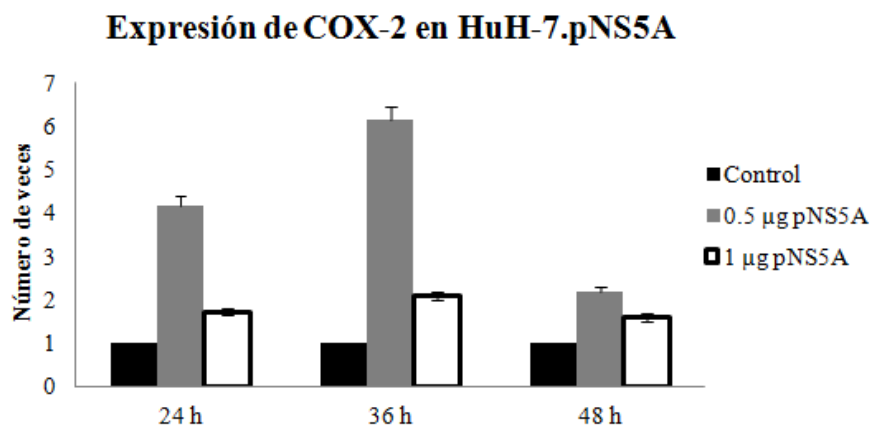
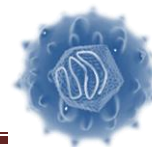


Fig. 21 Efecto de la expresión de proteínas virales sobre la expresión de COX-2 en células HuH-7 transfectadas con pNS5A. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pNS5A que expresa la proteína no-estructural NS5A del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos 0, 24, 36 y 48h



Gráfica 3. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HuH-7 transfectadas con el plásmido pNS5A. Se comparan las células transfectadas con pNS5A contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.

7.10 Transfección transitoria de células HepG2 con pNS5A. Expresión de proteína no-estructural NS5A del VHC.

Se realizó Western blot para identificar la proteína COX-2 y el análisis densitométrico mostró que el nivel de proteína COX-2 se incrementó 1 vez con respecto al control al utilizar 0.5 y 1 µg pNS5A, además no hubo una variación en la expresión de COX-2 con el paso del tiempo. Esto sugiere que, en comparación con la línea celular HuH-7, en HepG2 el efecto de la proteína no estructural NS5A sobre el incremento de COX-2 no es tan evidente.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2

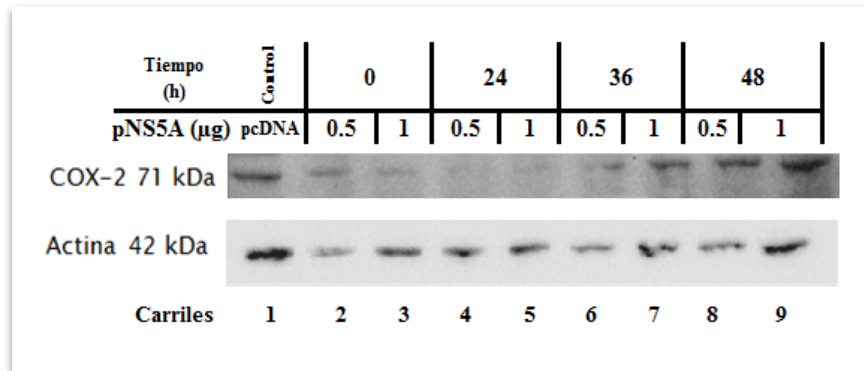
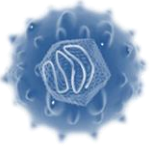
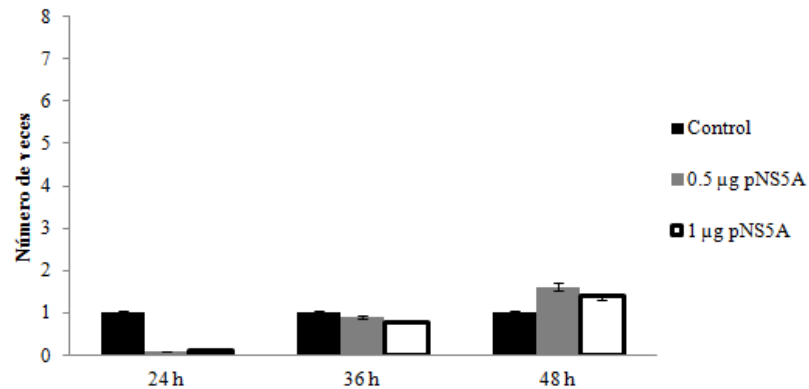
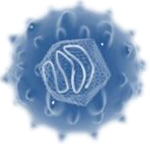


Fig. 22 Efecto de la expresión de proteínas virales sobre la expresión de COX-2 en células HepG2 transfectadas con pNS5A. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pNS5A que expresa la proteína no-estructural NS5A del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos 0, 24, 36 y 48h.

Expresión de COX-2 en HepG2 pNS5A



Gráfica 4. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HepG2 transfectadas con el plásmido pNS5A. Se comparan las células transfectadas con pNS5A contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.



7.11 Transfección transitoria de células HuH-7 con pE2. Expresión de proteína estructural E2 del VHC.

De acuerdo al análisis densitométrico, realizado con el programa ImageJ, se observó que en presencia de 0.5 μg pE2, el nivel de proteína COX-2 presentó un incremento a las 24 y 48 h post-transfección alrededor de 3 veces con respecto al control (pcDNA, plásmido vacío), a las 36 h el nivel de proteína COX-2 se vio disminuido a 2 veces; en comparación con el incremento de COX-2 cuando se utilizó 1 μg pE2 en donde se presentó solamente el doble de proteína con respecto al control a las 24h, disminuyendo progresivamente hacia las 36 y 48 h post-transfección, lo que se puede deber a que haya una saturación en el RE que inhiba la traducción de COX-2 y de proteínas en general por un exceso de plásmido. Además el incremento de COX-2 no es tan evidente como lo ocurrido cuando las células se transfectaron con el plásmido que expresa las proteínas no estructurales.

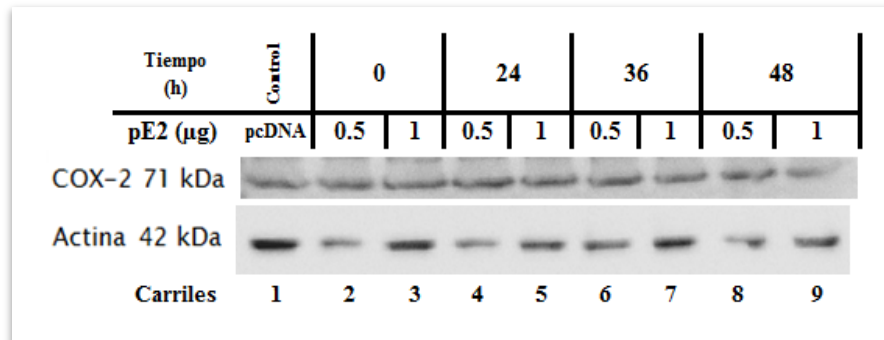
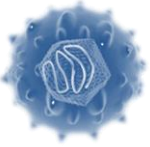
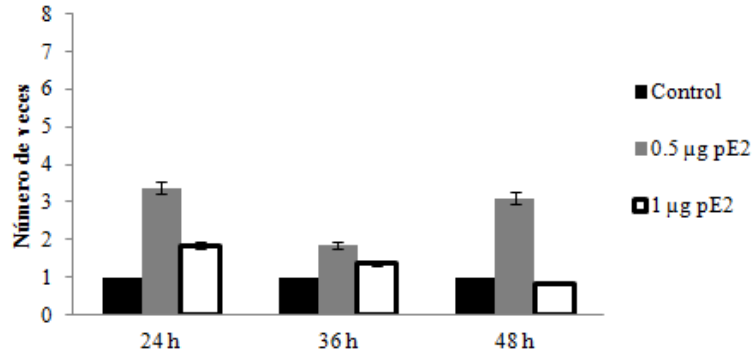


Fig. 23 Efecto de la expresión de proteínas virales sobre la expresión de COX-2 en células HuH-7 transfectadas con pE2. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pE2 que expresa la proteína de envoltura E2 del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos 0, 24, 36 y 48h.



Expresión de COX-2 en HuH-7.pE2



Gráfica 5. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HuH-7 transfectadas con el plásmido pE2. Se comparan las células transfectadas con pE2 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.

7.12 Transfección transitoria de células HepG2 con pE2. Expresión de proteína estructural E2 del VHC.

Se realizó Western blot para identificar la proteína COX-2 y el análisis densitométrico mostró que el nivel de proteína COX-2 se incrementó 5 veces hacia las 36 h cuando se utilizó 0.5 µg de plásmido pE2, disminuyendo a las 48h con respecto al control y lo mismo pasó cuando se utilizó 1µg pE2, sin embargo el incremento fue de hasta 3 veces a las 36h; en comparación con el nivel deCOX-2 expresado en HuH-7, la semicuantificación densitométrica en HepG2 mostró un mayor incremento en la proteína COX-2.

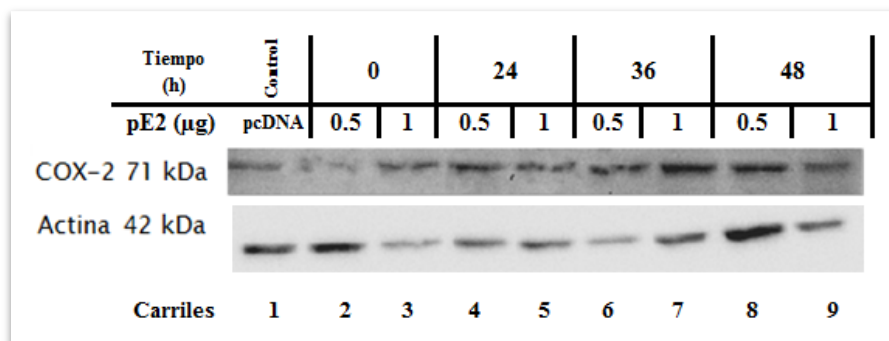
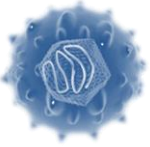
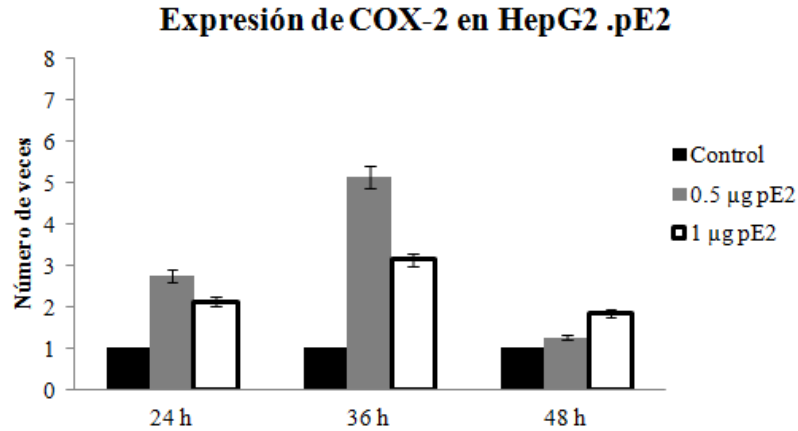


Fig.24 Efecto de la expresión de proteínas virales sobre la expresión de COX-2 en células HepG2 transfectadas con pE2. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pE2 que expresa la proteína de envoltura E2

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos 0, 24, 36 y 48h.



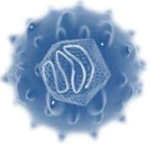
Gráfica 6. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HepG2 transfectadas con el plásmido pE2. Se comparan las células transfectadas con pE2 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los niveles de expresión de COX-2 a partir de la transfección transitoria de cada uno de los plásmidos pFK1, pNS5A y pE2 que expresan las proteínas virales del VHC en las 2 líneas celulares HuH-7 y HepG2 a los tiempos 24, 36 y 48 h post-transfección, se determinó utilizar el tiempo de 36 h para realizar los posteriores ensayos de co-transfección transitoria de cada uno de los plásmidos anteriormente mencionados con el plásmido pCOX-2.

Objetivo 3. Evaluar si existe diferencia en los niveles de COX-2 entre las líneas celulares HuH-7 y HepG2 co-transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas no estructurales, la de envoltura E2, no- estructural NS5A y COX-2.

Existen reportes que relacionan la expresión de las proteínas virales estructurales (core) (Nunez, Fernandez-Martinez et al. 2004) (Waris and Siddiqui 2005) y no estructurales (NS2-NS5B) del VHC con la expresión de la enzima COX-2 vía expresión de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 y por estrés oxidativo. Además hay reportes que

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



asocian el estrés oxidativo con la expresión inducida de COX-2. Basados en esta observación de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen cinasas (tirosina, serina/treonina cinasas), las cuales son capaces de activar factores de transcripción tales como AP-1, NF- κ B y NF-IL6, que a su vez inducen la expresión de COX-2 (Tardif, Waris et al. 2005; Waris and Siddiqui 2005). La expresión de COX-2 se ha relacionado con el desarrollo de fibrosis y carcinoma hepatocelular en humanos, por esto es importante evaluar si la activación de la proteína COX-2 está involucrada en la expresión génica de VHC (Nunez, Fernandez-Martinez et al. 2004). Para esto se evaluó el efecto de COX-2 sobre las proteínas virales y viceversa a 2 niveles: a nivel transcripcional de COX-2 y RNA-VHC y a nivel traduccional de COX-2 (Fig 25).

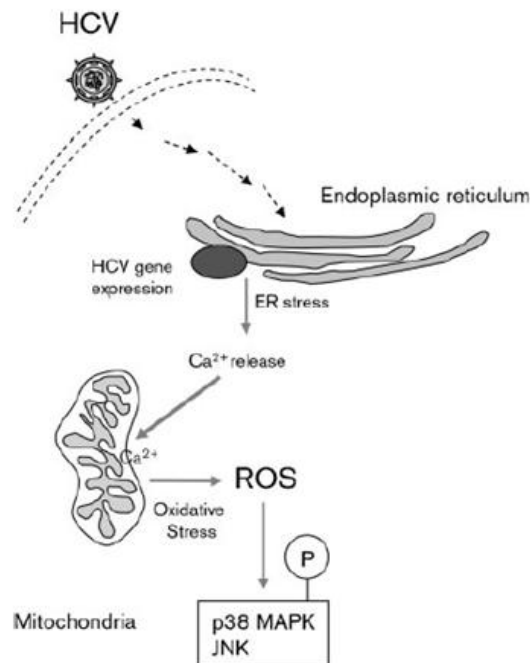
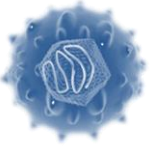


Fig.25 Modelo que ilustra el mecanismo por el cual las proteínas virales inducen estrés oxidativo. La expresión génica de VHC hace que el retículo endoplásmico se libere Ca^{2+} por la desestabilización de su membrana causado por la producción de proteínas no plegadas, lo que subsecuentemente la mitocondria lo absorbe. La elevada concentración de Ca^{2+} en la mitocondria induce ROS, lo que fosforila distintas vías de señalización como las MAP cinasas involucradas en la supervivencia celular. (Burdette, Olivarez et al. 2010)

Para evaluar el efecto de la presencia de proteínas virales sobre la COX-2 en las células HuH-7 y HepG2, éstas fueron infectadas con el virus vaccinia recombinante por 1 hora, seguido de una transfección transitoria con plásmidos que expresan las proteínas virales

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



pFK1, pNS5A y pE2, cada uno a 2 cantidades (0.2 μg y 0.5 μg), además se realizó la co-transfección con el plásmido pCOX-2 (0.1 y 0.5 μg); la expresión de éstos plásmidos se encuentra dirigido bajo el control del promotor de la T7 ARN polimerasa. A las 36 h post-transfección las células fueron cosechadas y se extrajeron las proteínas totales que fueron sujetas a Western blot las cuales fueron cuantificadas por el método de Bradford; por otro lado, en otro ensayo de transfección transitoria, las células transfectadas fueron lisadas para la extracción de ARN por el método de TRIzol[®]. Para los ensayos de Western blot se utilizó la proteína actina para normalizar. Para los ensayos de RT-PCR en tiempo real se utilizó la GAPDH.

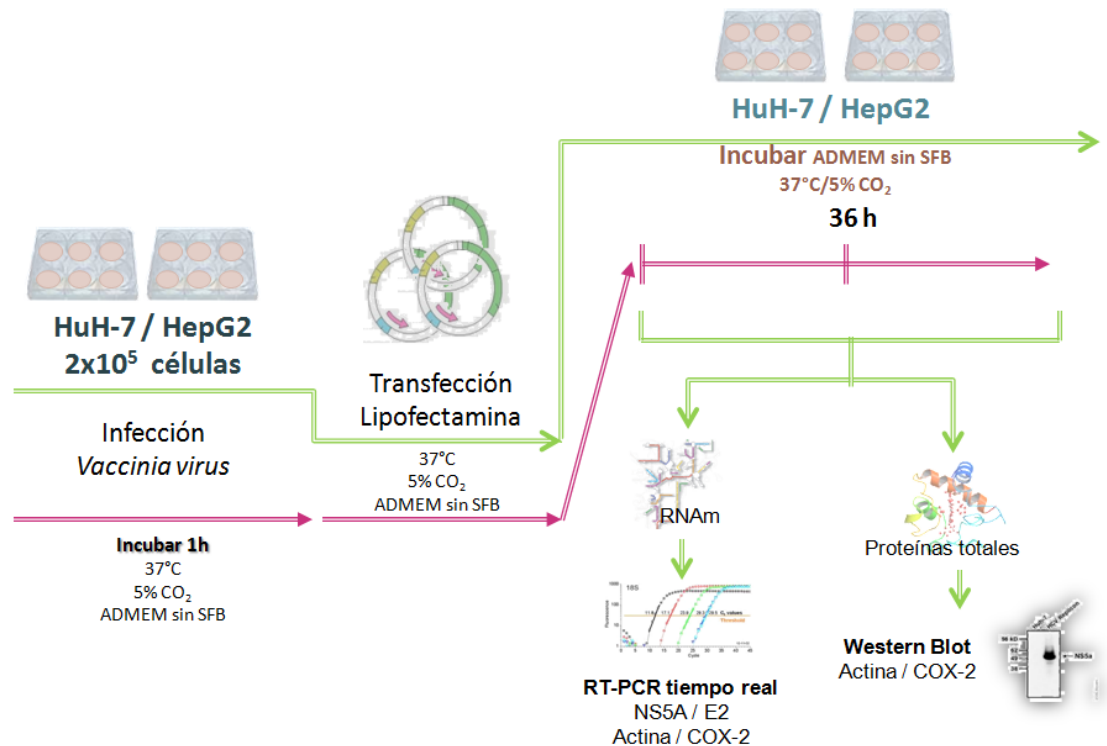
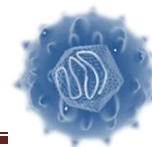
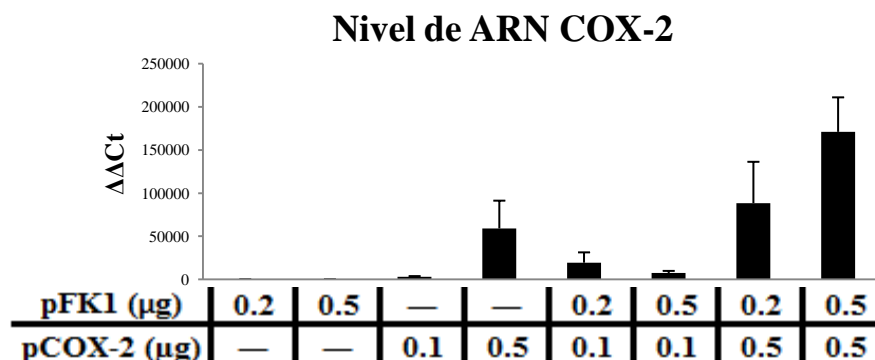
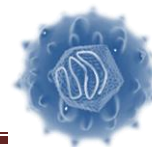


Fig. 26. Esquema de co-transfección transitoria. Se utilizaron 2×10^5 células por pozo, las cuales fueron infectadas con *vaccinia virus* para expresar la polimerasa T7, después de 1 h de infección se realizó la co-transfección de los plásmidos que expresan las proteínas virales (pFK1, pNS5A y pE2) con el plásmido pCOX-2, que están bajo el control del promotor T7 Polimerasa. Se extrajeron proteínas y ARN a las 36 h post-transfección.

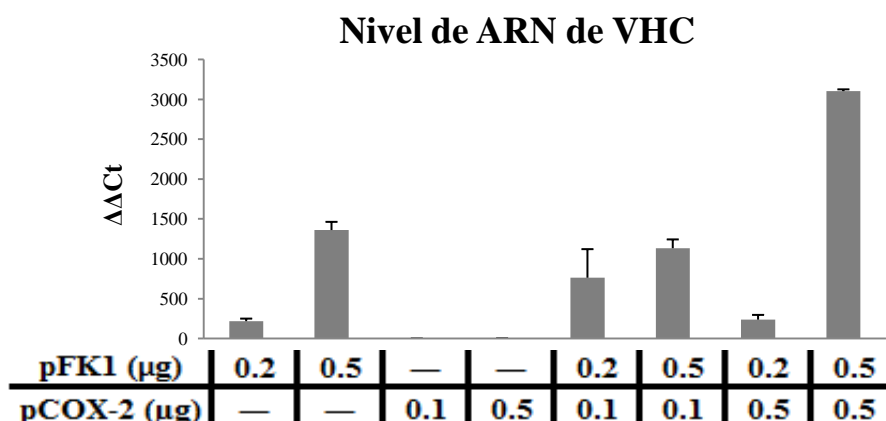


7.13 Transfección transitoria de células HuH-7 con pFK1pCOX-2.

La expresión de las proteínas no-estructurales (NS) del VHC promueven la expresión del ARNm de COX-2 y proteína en la línea celular HuH-7, que fue transfectada transitoriamente con el plásmido pFK1 y co-transfectada con pCOX-2, al mismo tiempo se observa que en presencia de las proteínas virales, se presenta un incremento en la proteína COX-2, en comparación con las células que solo fueron transfectadas con el plásmido pFK1 y pCOX-2 por separado. Para comprobar que la expresión de las proteínas NS del VHC inducen la expresión de COX-2 se utilizó el plásmido pCOX-2 en dos cantidades (0.1 y 0.5 μg) y co-transfección con cantidades crecientes de plásmido pFK1₃₈₉-NS3-3' (0.2 y 0.5 μg). Los resultados muestran que en presencia de las proteínas virales NS median la activación del promotor de COX-2 de manera dosis-dependiente cuando se utiliza 0.5 μg pCOX-2; al igual la sobreexpresión de COX-2 incrementa el nivel de ARN-VHC al ser co-transfectado 0.2 y 0.5 μg pFK1 con 0.5 μg pCOX-2. Sin embargo a nivel de proteína COX-2, al co-transfectar pFK1 a las células con 0.2 μg pFK1 se incrementa la proteína expresada, pero al co-transfectar con 0.5 μg pFK1 el nivel de proteína COX-2 disminuye con respecto al control, por lo que puede haber una saturación en el RE por parte de proteínas no-plegadas que disminuya la expresión.



Gráfica 7. Cuantificación relativa por el método de $\Delta\Delta C_t$ de ARN-COX-2 del efecto de la co-transfección de pFK1 y pCOX-2 en HuH-7 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pFK1 que expresa las proteínas de no-estructurales del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-COX2 fueron normalizados con base a la relación COX2/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de COX-2 (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos



Gráfica 8. Cuantificación relativa de ARN-VHC del efecto de la co-transfección de pFK1 y pCOX-2 en HuH-7 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pFK1 que expresa las proteínas de no-estructurales del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-VHC fueron normalizados con base a la relación VHC/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de VHC (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.

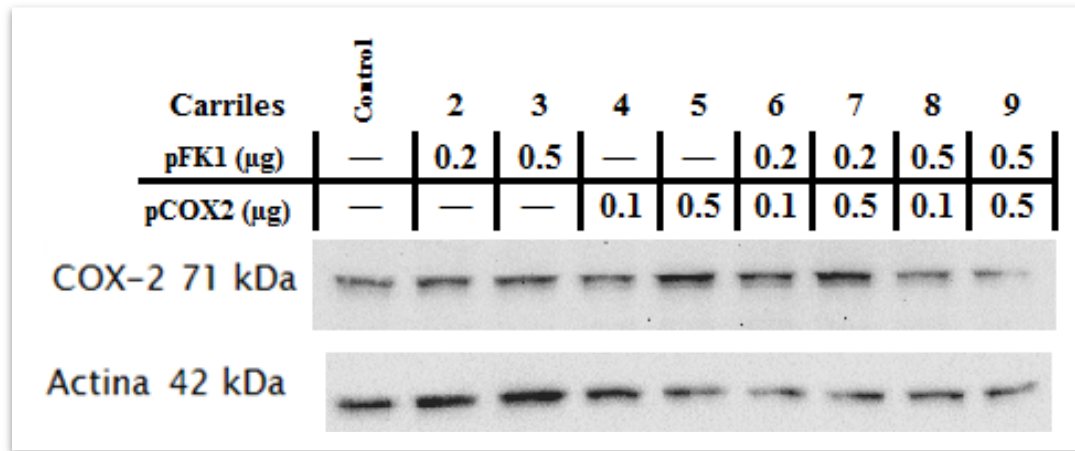
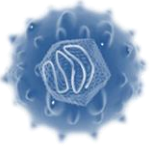
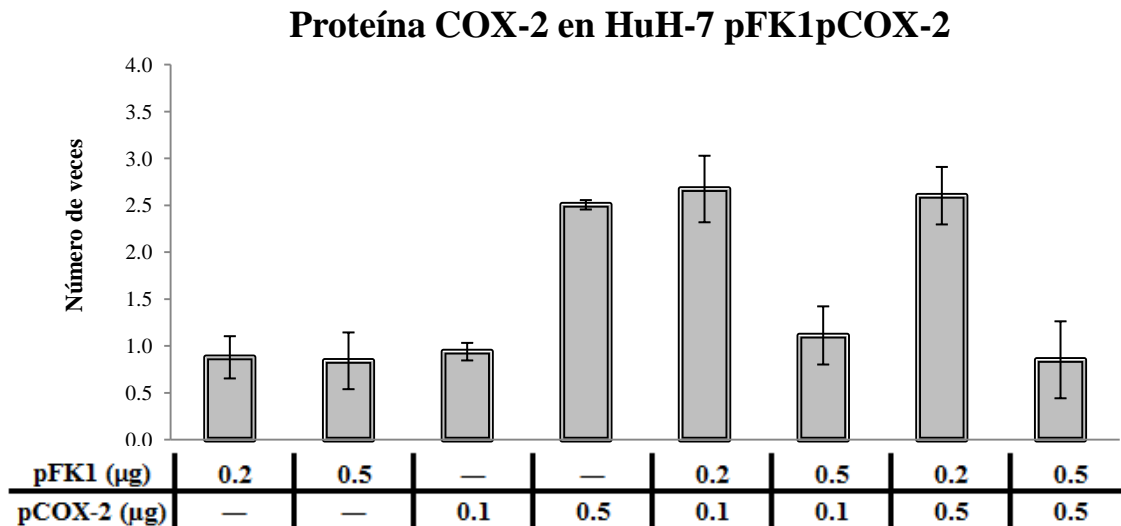
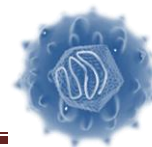


Fig. 27 Efecto de la expresión de sobreexpresión de COX-2 y de proteínas virales en células HuH-7 co-transfectadas con pFK1pCOX2. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pFK1 que expresa las proteínas no-estructurales del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos a las 36h post-transfección. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el Western blot para detectar los niveles de las proteínas COX-2 (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas COX-2/actina fue semicuantificada con el programa ImageJ.

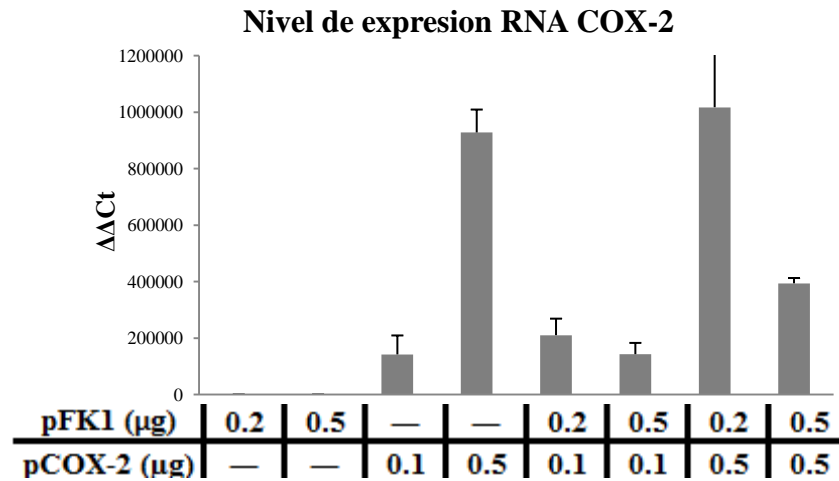
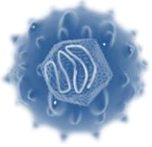


Gráfica 9. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HuH-7 transfectadas con el plásmido pFK1 y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2. Se comparan las células co-transfectadas con pFK1pCOX-2 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.

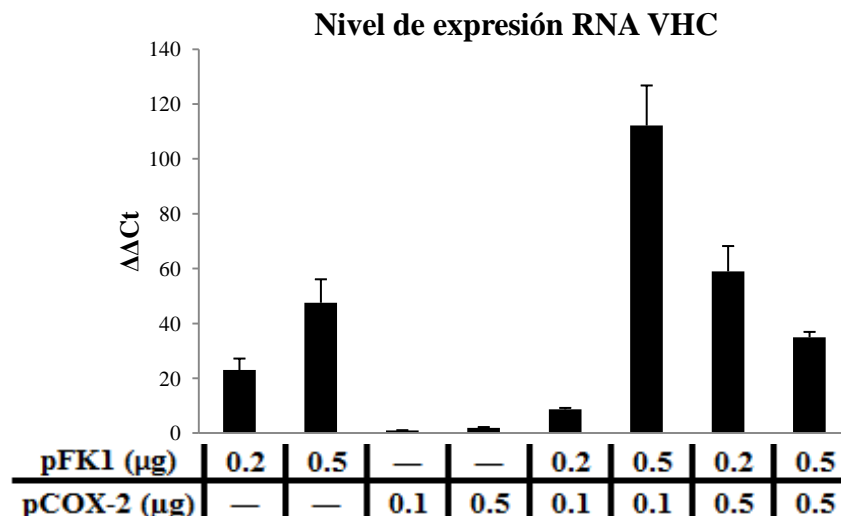


7.14 Transfección transitoria de células HepG2 con pFK1pCOX-2.

La expresión de las proteínas no-estructurales (NS) del VHC promueven la expresión del RNAm de COX-2 y proteína COX-2 en la línea celular HepG2, que fue transfectada transitoriamente con el plásmido pFK1 y co-transfectada con pCOX-2; en presencia de las proteínas virales, se presenta un incremento en la proteína COX-2, en comparación con las células que solo fueron transfectadas con el plásmido pFK1 y pCOX-2 por separado. Para comprobar que la expresión de las proteínas NS del VHC inducen la expresión de COX-2 se utilizó el plásmido pCOX-2 en dos cantidades (0.1 y 0.5 μg) y co-transfección con cantidades crecientes de plásmido pFK1₃₈₉-NS3-3' (0.2 y 0.5 μg). Los resultados muestran que en presencia de las proteínas virales NS median la activación del promotor de COX-2 cuando se utiliza 0.1 μg pCOX-2, no así cuando se utilizan 0.5 μg pCOX-2 y 0.5 μg pFK1, en donde el nivel de ARN-COX-2 disminuyó con respecto al tratamiento en donde solo se utilizó 0.5 μg pCOX-2 de manera individual; al igual la sobreexpresión de COX-2 incrementa el nivel de ARN-VHC al ser co-transfectado 0.2 μg pFK1 con 0.2 y 0.5 μg pCOX-2. Sin embargo a nivel de proteína COX-2, al co-transfectar 0.2 y 0.5 μg pFK1 a las células HepG2 se incrementa la proteína expresada de manera dosis-dependiente respecto al plásmido pCOX-2.



Gráfica 10. Cuantificación relativa por el método de $\Delta\Delta Ct$ de ARN-COX-2 del efecto de la co-transfección de pFK1 y pCOX-2 en HepG2 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pFK1 que expresa las proteínas de no-estructurales del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-COX2 fueron normalizados con base a la relación COX2/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de COX-2 (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.



Gráfica 11. Cuantificación relativa de ARN-VHC del efecto de la co-transfección de pFK1 y pCOX-2 en HepG2 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pFK1 que expresa las proteínas de no-estructurales del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-VHC fueron normalizados con base a la relación VHC/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de VHC (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.

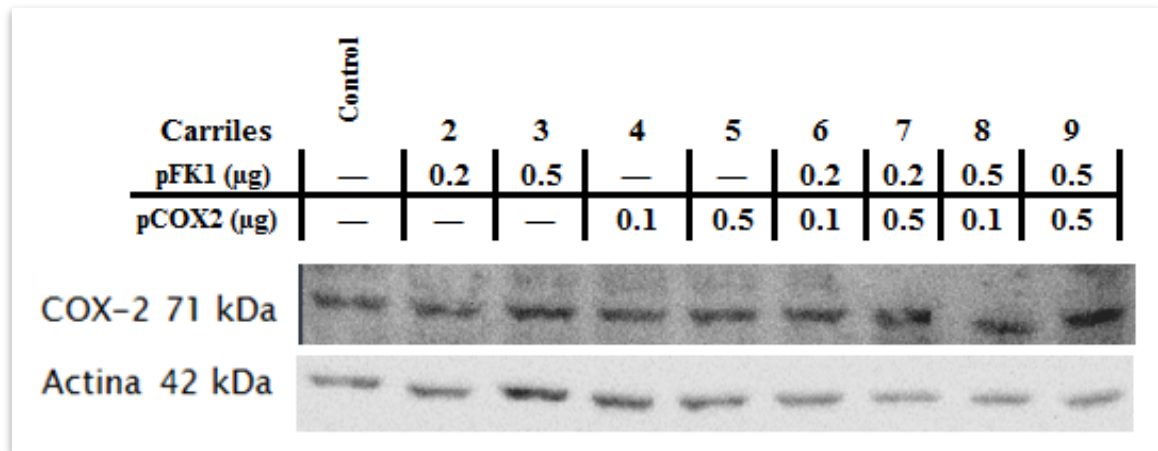
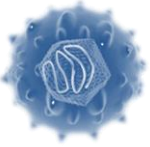
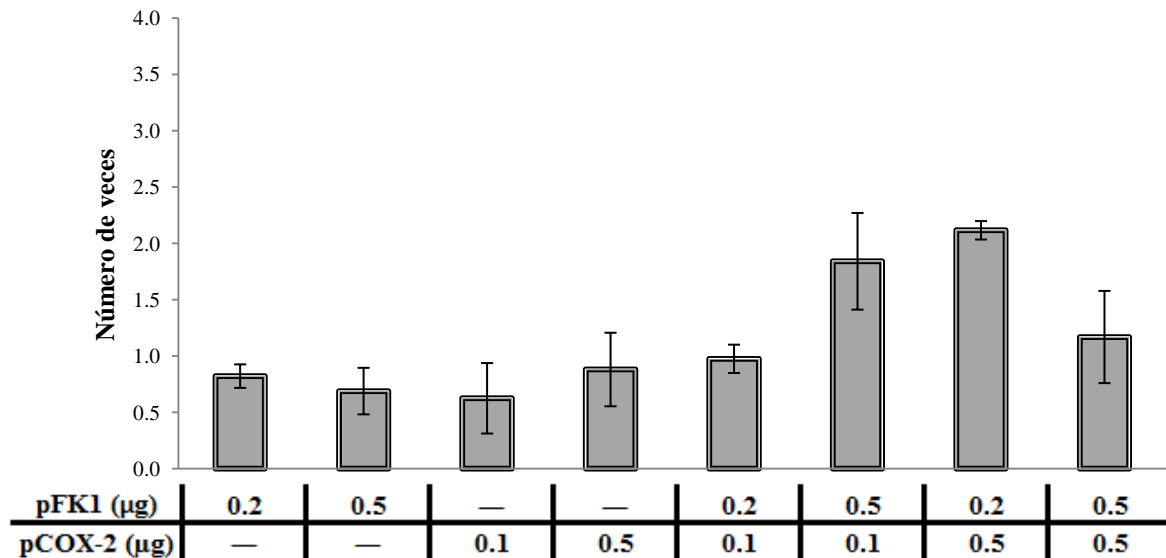
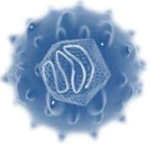


Fig.28. Efecto de la expresión de sobreexpresión de COX-2 y de proteínas virales en células HepG2 co-transfectadas con pFK1pCOX2. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pFK1 que expresa las proteínas no-estructurales del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos a las 36h post-transfección. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el Western blot para detectar los niveles de las proteínas COX-2 (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas COX-2/actina fue semicuantificada con el programa ImageJ.

Proteína COX-2 en HepG2 pFK1pCOX-2

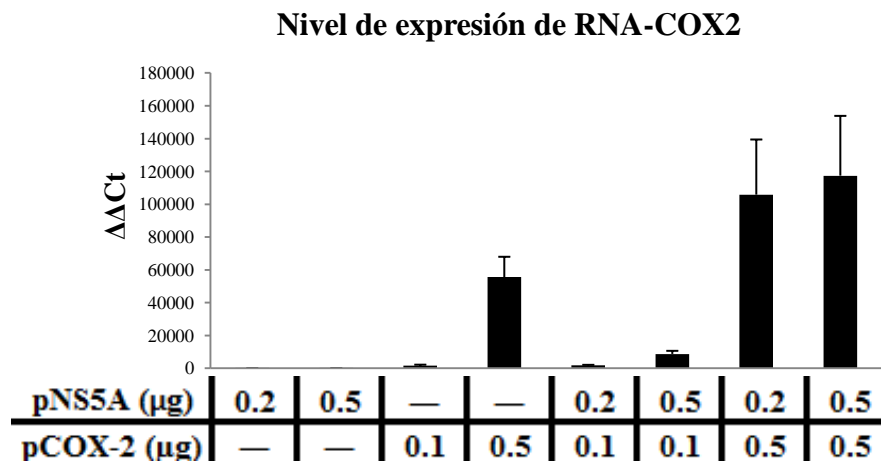


Gráfica 12. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HepG2 transfectadas con el plásmido pFK1 y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2. Se comparan las células co-transfectadas con pFK1pCOX-2 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.



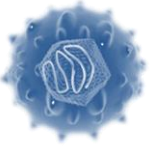
7.15 Transfección transitoria de células HuH-7 con pNS5ApCOX-2.

Al evaluar la expresión de la proteína no-estructural NS5A del VHC se encontró que ésta promueve un incremento en la expresión del ARNm de COX-2 y proteína COX-2 en la línea celular HuH-7, que fue transfectada transitoriamente con el plásmido pNS5A y co-transfectada con pCOX-2. Para comprobar que la expresión de la proteína NS5A del VHC induce la expresión de COX-2 se utilizó el plásmido pCOX-2 en dos cantidades (0.1 y 0.5 μg) y co-transfección con cantidades crecientes de plásmido pNS5A (0.2 y 0.5 μg). Los resultados muestran que NS5A media la activación del promotor de COX-2 de manera dosis-dependiente, en ARN-NS5A y ARN-COX-2. Sin embargo al evaluar el nivel de proteína COX-2, en la co-transfección con pNS5A, el nivel de expresión de COX-2 no fluctúa en las células transfectadas y co-transfectadas con pCOX-2, encontrándose entre 4-5 veces con respecto al control.

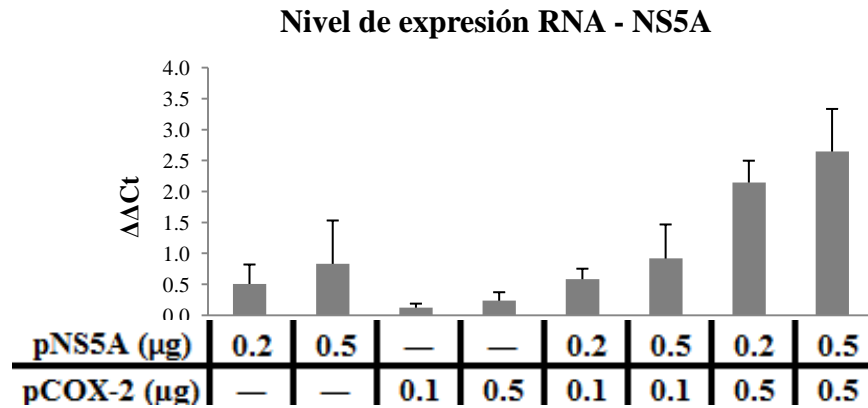


Gráfica 13. Cuantificación relativa por el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ de ARN-COX-2 del efecto de la co-transfección de pNS5A y pCOX-2 en HuH-7 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pNS5A que expresa la proteína de no-estructural NS5A del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-COX2 fueron normalizados con base a la relación COX2/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de COX-2 (número de veces) con respecto al control (células

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.



Gráfica 14. Cuantificación relativa de ARN-VHC del efecto de la co-transfección de pNS5A y pCOX-2 en HuH-7 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pNS5A que expresa la proteína de no-estructural NS5A del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-NS5A fueron normalizados con base a la relación NS5A/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de NS5A (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.

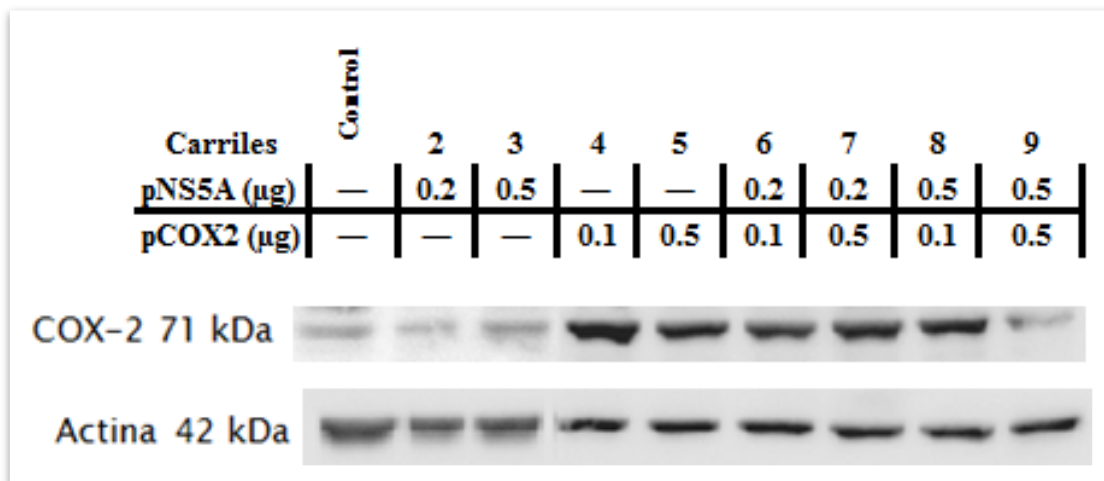
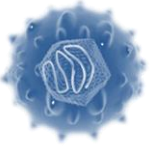
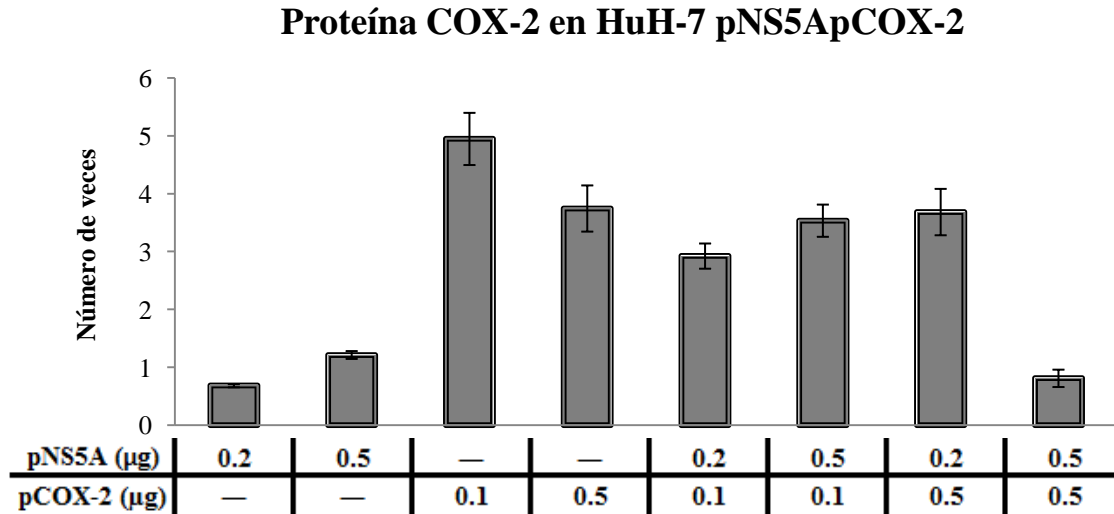


Fig.29. Efecto de la expresión de sobreexpresión de COX-2 y de proteínas virales en células HuH7 co-transfectadas con pNS5ApCOX2. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pNS5A que expresa la proteína no-estructural NS5A del VHC. La

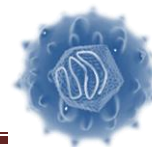
Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos a las 36h post-transfección. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el Western blot para detectar los niveles de las proteínas COX-2 (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas COX-2/actina fue semicuantificada con el programa ImageJ.

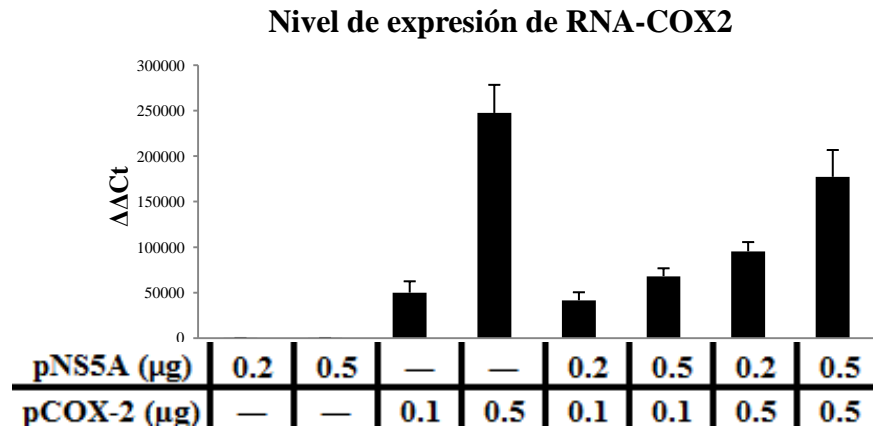
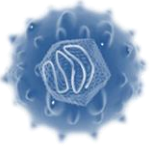


Gráfica 15. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HuH-7 transfectadas con el plásmido pNS5A y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2. Se comparan las células co-transfectadas con pNS5ApCOX-2 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.

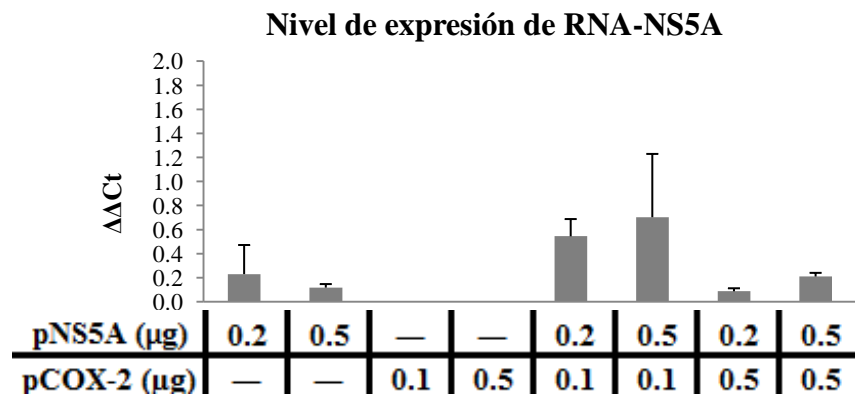


7.16 Transfección transitoria de células HepG2 con pNS5ApCOX-2.

En la línea celular HepG2 al evaluar la expresión de la proteína no-estructural NS5A del VHC se encontró que ésta promueve un incremento en la expresión del ARNm de COX-2 directamente proporcional a las cantidades de plásmido utilizadas en la co-transfección, es decir, entre mayor cantidad de plásmido pNS5A y pCOX-2 co-transfectado, se presentó un aumento en el nivel de ARN-COX2. Para comprobar que la expresión de la proteína NS5A del VHC induce la expresión de COX-2 se utilizó el plásmido pCOX-2 en dos cantidades (0.1 y 0.5 μ g) y co-transfección con cantidades crecientes de plásmido pNS5A (0.2 y 0.5 μ g). Los resultados muestran que NS5A media la activación del promotor de COX-2 de manera dosis-dependiente a nivel de ARN-COX-2; el nivel de ARN-NS5A se ve incrementado solamente cuando las células se co-transfectan con 0.1 μ g pCOX-2. Sin embargo al evaluar el nivel de proteína COX-2, en la co-transfección con pNS5A, el nivel de expresión de COX-2 no fluctúa en las células transfectadas y co-transfectadas con pCOX-2, encontrándose 2 veces incrementadas con respecto al control, cabe mencionar que la proteína COX-2 producida en HepG2 es menor que la que se expresó en HuH-7 (4-5 veces más).



Gráfica 16. Cuantificación relativa por el método de $\Delta\Delta Ct$ de ARN-COX-2 del efecto de la co-transfección de pNS5A y pCOX-2 en HepG2 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pNS5A que expresa la proteína de no-estructural NS5A del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-COX2 fueron normalizados con base a la relación COX2/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de COX-2 (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.



Gráfica 17. Cuantificación relativa de ARN-NS5A del efecto de la co-transfección de pNS5A y pCOX-2 en HepG2 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pNS5A que expresa la proteína de no-estructural NS5A del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-NS5A fueron normalizados con base a la relación NS5A/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de NS5A (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.

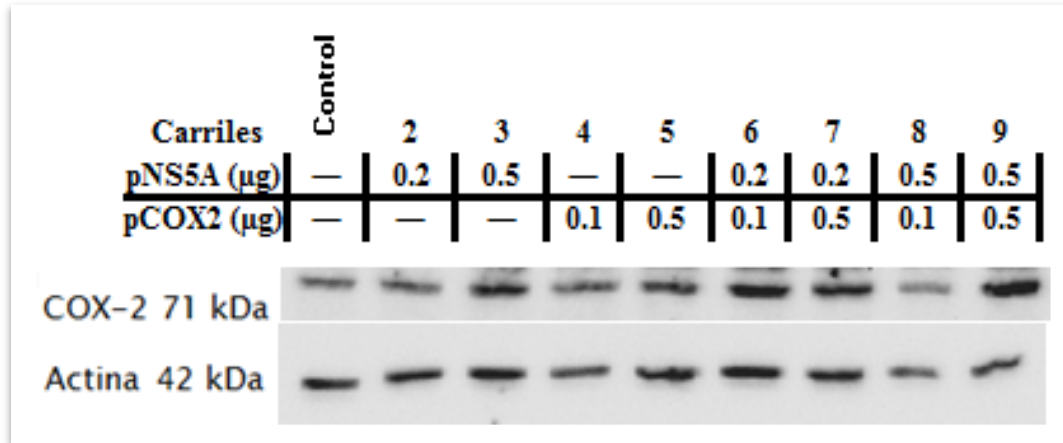
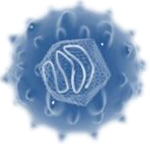
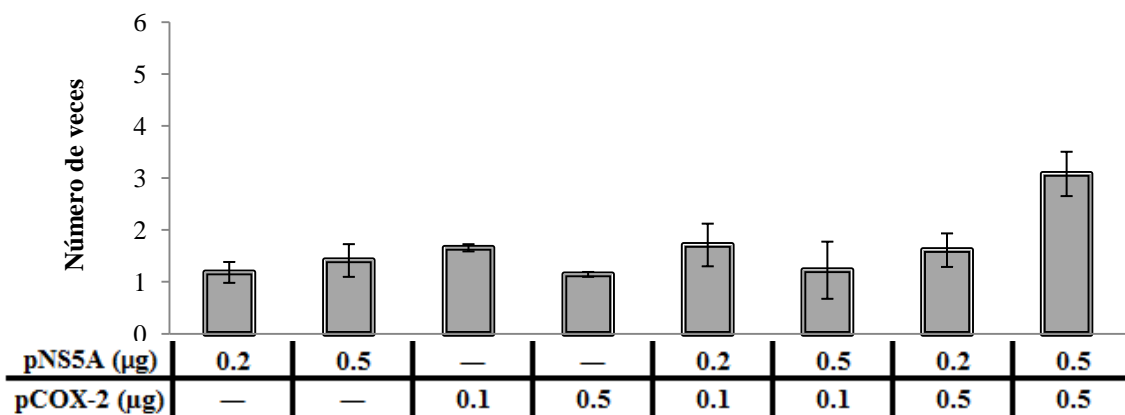
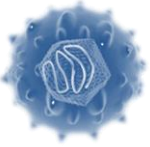


Fig.30. Efecto de la expresión de sobreexpresión de COX-2 y de proteínas virales en células HepG2 co-transfectadas con pNS5ApCOX2. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pNS5A que expresa la proteína no-estructural NS5A del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos a las 36h post-transfección. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el Western blot para detectar los niveles de las proteínas COX-2 (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas COX-2/actina fue semicuantificada con el programa ImageJ.

Proteína COX-2 en HepG2 pNS5ApCOX-2

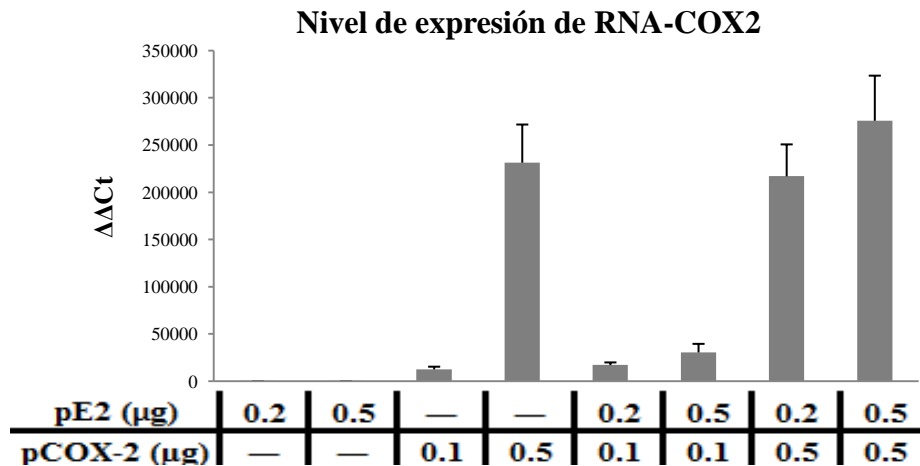


Gráfica 18. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HepG2 transfectadas con el plásmido pNS5A y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2. Se comparan las células co-transfectadas con pNS5ApCOX-2 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.

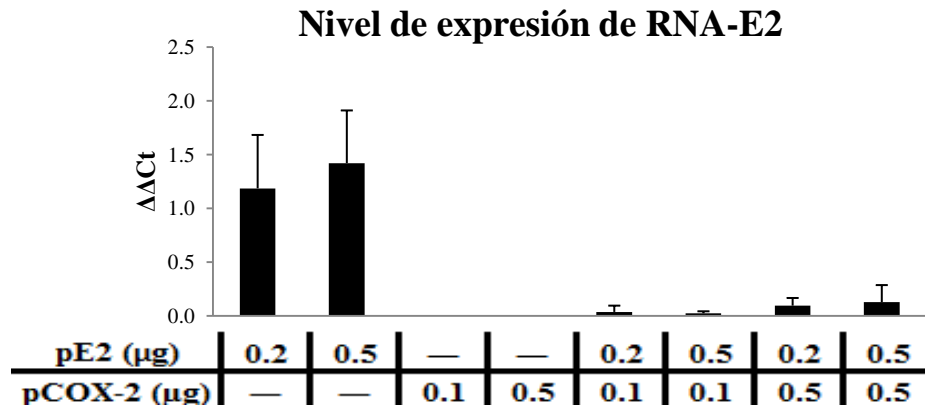
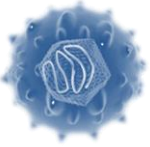


7.17 Transfección transitoria de células HuH-7 con pE2pCOX-2.

Al evaluar la expresión de la proteína estructural E2 del VHC se encontró que ésta no promueve un incremento en la expresión del ARNm de COX-2 cuando se co-transfecta HuH-7 con pCOX-2, en comparación a la transfección con el plásmido pE2 de manera individual. Si se compara el nivel de expresión a nivel de proteína entre ambas líneas celulares, se observa una disminución de COX-2 en la línea celular HuH-7 en comparación con la línea HepG2.



Gráfica 19. Cuantificación relativa por el método de $\Delta\Delta C_t$ de ARN-COX-2 del efecto de la co-transfección de pE2 y pCOX-2 en HuH-7 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pE2 que expresa la proteína estructural E2 del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-COX2 fueron normalizados con base a la relación COX2/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de COX-2 (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.



Gráfica 20. Cuantificación relativa de ARN-E2 del efecto de la co-transfección de pE2 y pCOX-2 en HuH-7 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pE2 que expresa la proteína de estructural E2 del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-E2 fueron normalizados con base a la relación E2/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de E2 (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.

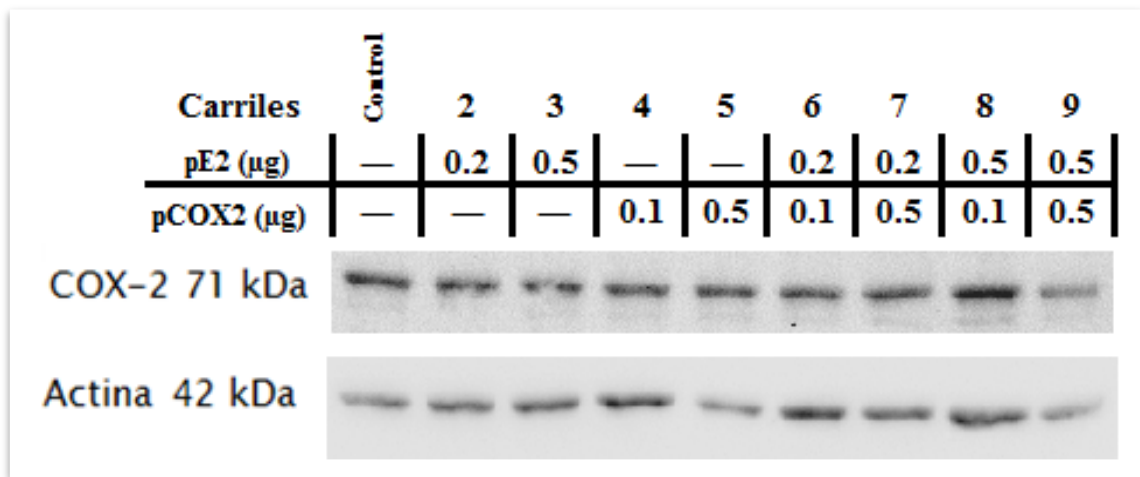
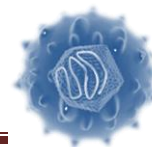
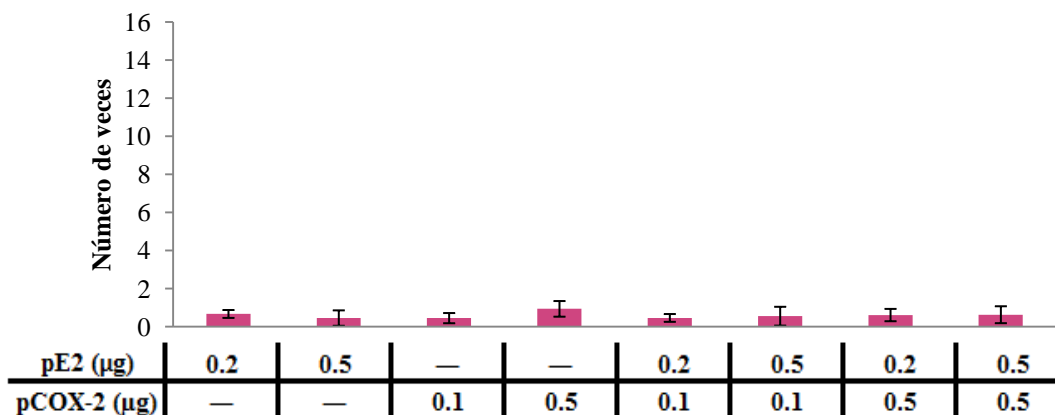


Fig. 31. Efecto de la expresión de sobreexpresión de COX-2 y de proteínas virales en células HuH-7 co-transfectadas con pE2pCOX2. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pE2 que expresa la proteína estructural E2 del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos a las 36h post-transfección. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el Western blot para detectar los niveles de las proteínas COX-2 (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas COX-2/actina fue semicuantificada con el programa ImageJ.



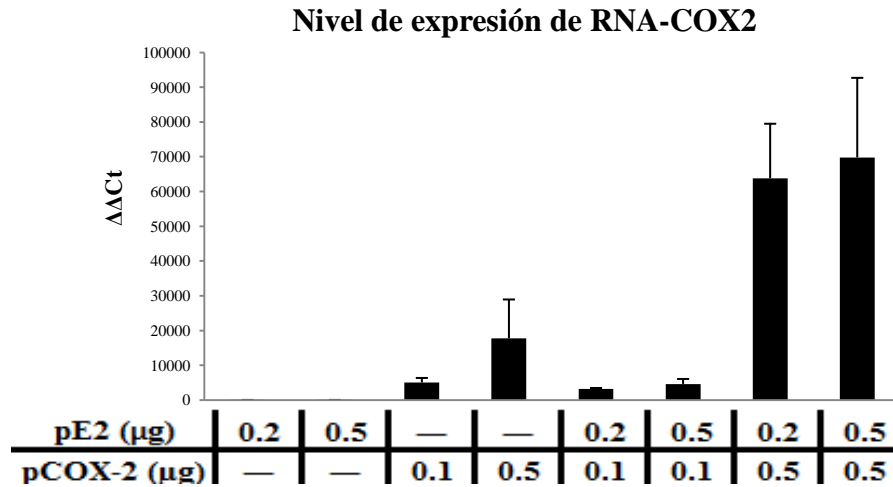
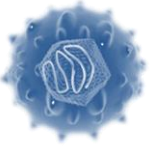
Proteína COX-2 en HuH-7 pE2pCOX-2



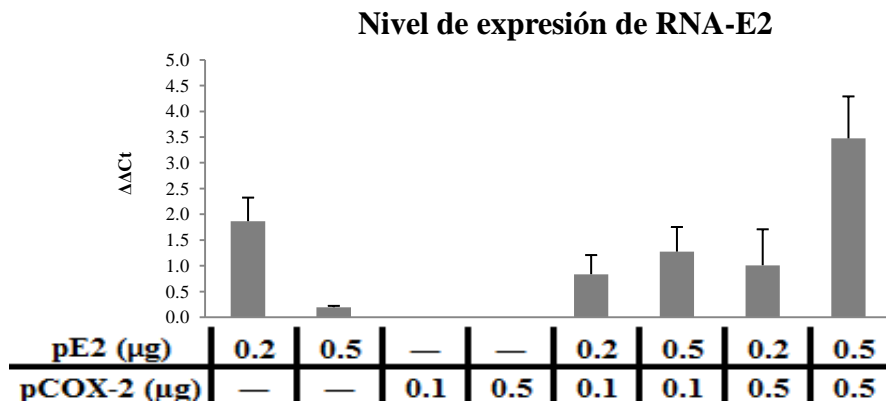
Gráfica 21. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HuH-7 transfectadas con el plásmido pE2 y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2. Se comparan las células co-transfectadas con pE2pCOX-2 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.

7.18 Transfección transitoria de células HepG2 con pE2pCOX-2.

En la línea celular HepG2, al evaluar la expresión de la proteína estructural E2 del VHC se encontró que ésta promueve un incremento en la expresión del ARNm de COX-2 y del ARNm de E2 cuando se co-transfecta HepG2 con pCOX-2 de manera directamente proporcional a la cantidad de plásmido utilizada, en comparación a la transfección con el plásmido pE2 de manera individual; la proteína COX-2 producida se ve incrementada en la línea celular HepG2 en comparación con la línea HuH-7.



Gráfica 22. Cuantificación relativa por el método de $\Delta\Delta Ct$ de ARN-COX-2 del efecto de la co-transfección de pE2 y pCOX-2 en HepG2 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pE2 que expresa la proteína estructural E2 del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-COX2 fueron normalizados con base a la relación COX2/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de COX-2 (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.



Gráfica 23. Cuantificación relativa de ARN-E2 del efecto de la co-transfección de pE2 y pCOX-2 en HepG2 a 36h. 5×10^4 células sembradas en una caja de 24 pozos fueron transfectadas con el plásmido pE2 que expresa la proteína de estructural E2 del VHC y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2; el ensayo se normalizó con el gen endógeno GAPDH. Los niveles de RNA-E2 fueron normalizados con base a la relación E2/GAPDH ARNm. Los resultados están expresados en como niveles de ARN de E2 (número de veces) con respecto al control (células transfectadas con plásmido vacío pcDNA) que se define como 1. Los valores representan el promedio de tres experimentos.

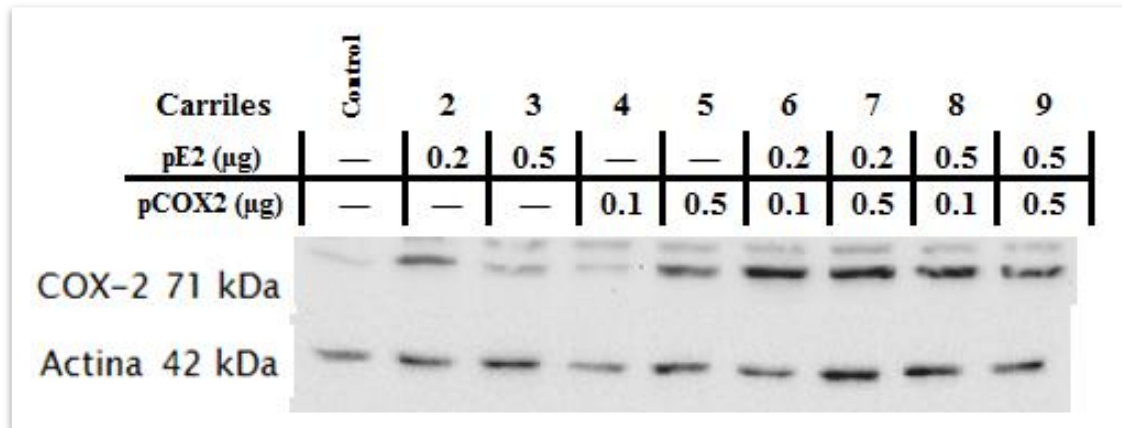
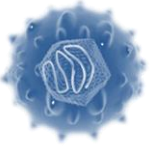
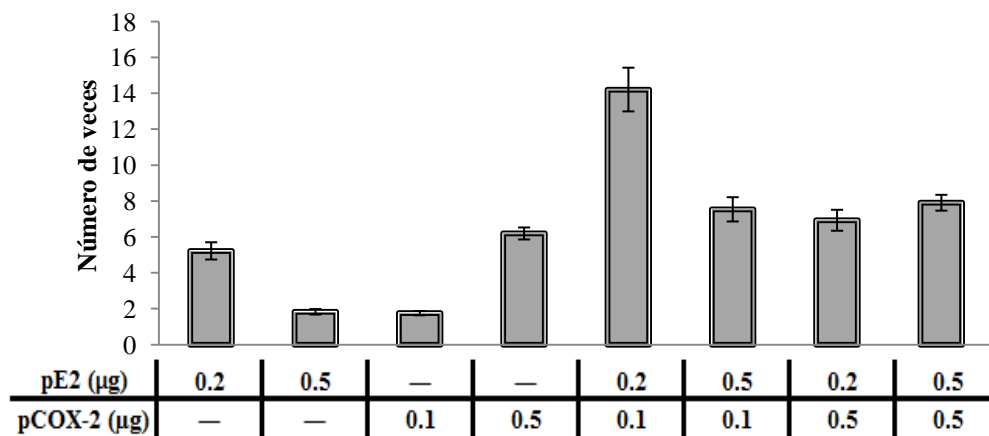
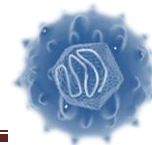


Fig. 32. Efecto de la expresión de sobreexpresión de COX-2 y de proteínas virales en células HepG2 co-transfectadas con pE2pCOX2. 2×10^5 células sembradas en una caja de 6 pozos fueron transfectadas con el plásmido pE2 que expresa la proteína estructural E2 del VHC. La evaluación del nivel de expresión de COX-2 se realizó a los tiempos a las 36h post-transfección. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el Western blot para detectar los niveles de las proteínas COX-2 (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas COX-2/actina fue semicuantificada con el programa ImageJ.

Proteína COX-2 en HepG2 pE2pCOX2



Gráfica 24. Análisis densitométrico de nivel de proteína COX-2 en células HepG2 transfectadas con el plásmido pE2 y co-transfectadas con el plásmido pCOX-2. Se comparan las células co-transfectadas con pE2pCOX-2 contra las transfectadas con el plásmido pcDNA, a las cuales se les asignó el valor de 1.



CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN

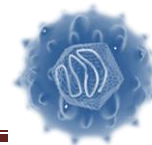
El virus de hepatitis C es un patógeno importante dada su prevalencia extremadamente alta (alrededor de 170 millones de personas infectadas en todo el mundo), la alta tasa de infección crónica y el riesgo significativo de hepatitis activa crónica grave y cirrosis entre los sujetos con infección crónica (Giannini and Brechot 2003). Los pacientes asintomáticos con enfermedad relativamente leve pueden progresar a un estado en fase terminal y desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC). Actualmente, no existe una vacuna contra el VHC y el tratamiento antiviral es el uso de interferón alfa pegilado y ribavirina sumándose recientemente uno de los dos inhibidores de proteasa (boceprevir o telaprevir); esto pone de relieve la necesidad de terapias más efectivas. Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la patología de las infecciones crónicas por VHC podría ser útil en la identificación de nuevos blancos terapéuticos contra esta enfermedad (Sarfraz, Hamid et al. 2008).

Las características distintivas de la infección crónica por VHC en el hígado son la inflamación, necrosis, daño hepatocelular, fibrosis y cáncer. El daño causado por la inflamación y la necrosis conduce generalmente a la proliferación de los hepatocitos restantes, una característica de la regeneración del hígado (Sarfraz, Hamid et al. 2008).

Diversos factores pueden influir en la progresión rápida de la hepatitis C, existe evidencia que indica el rol de la inflamación en el desarrollo y modulación de las diferentes etapas de la progresión del cáncer. La inflamación puede desempeñar un papel en la iniciación del tumor mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), responsables de daños en el ADN, lo que aumenta la tasa de mutaciones (Sobolewski, Cerella et al. 2010).

La modulación de las vías de pro-supervivencia o proteínas anti-apoptóticas hace que la expresión y activación de mediadores proinflamatorios (como $TNF\alpha$, $IL1\beta$, $IL6$, $IL8$, $Bcl-2$, $NF-\kappa B$) también sean un factor determinante en la quimiorresistencia. Una

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



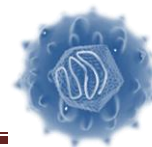
activación constitutiva de tales factores proinflamatorios se ha encontrado frecuentemente en muchos tipos de cáncer, como el carcinoma hepatocelular (Pikarsky, Porat et al. 2004), cáncer de próstata (Palayoor, Youmell et al. 1999), así como la leucemia mielocítica aguda y crónica (Kordes, Krappmann et al. 2000), donde es frecuentemente asociada con un mal pronóstico. En estos casos, se ha mostrado frecuentemente la modulación de Bcl-2, miembro de la familia anti-apoptótica. Entre los diferentes mediadores de la inflamación, las ciclooxigenasas (COXs) claramente parecen estar implicadas en el cáncer (Sobolewski, Cerella et al. 2010).

Actualmente está bien establecido que COX-2 es sobreexpresado crónicamente en muchos cánceres premalignos, malignos y metastásicos, incluyendo el carcinoma hepatocelular (CHC). La sobreexpresión de la COX-2 en pacientes con CHC es generalmente más alta en CHC diferenciado en comparación con CHC menos diferenciados ó con hígado histológicamente normal, lo que sugiere que COX-2 puede estar implicado en las primeras etapas de la hepatocarcinogénesis, y aumento de la expresión de COX-2 en tejido hepático no-canceroso se ha asociado significativamente con una menor supervivencia libre de enfermedad en pacientes con CHC (Cervello and Montalto 2006).

COX-2 puede ser blanco de varios compuestos que pueden inhibir sus funciones. Combinación de tales preferenciales o inhibidores selectivos de COX-2 con agentes anticancerígenos, que ya se utilizan en la clínica, fueron probados con el objetivo de mejorar la eficacia de protocolos anti-cáncer. COX-2 es el objetivo preferente de varios antiinflamatorios no esteroideos, (AINEs) (Green 2001).

El trabajo de Sir John Vane fue que delineó el mecanismo por el cual la aspirina ejerce sus acciones anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas. En la década de 1970, la enzima prostaglandina G/H sintasa, ahora más conocida como COX, fue identificada como la diana para la inhibición por la aspirina y otros AINEs. Desde este descubrimiento, ha habido un gran interés en la identificación de los componentes de la

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



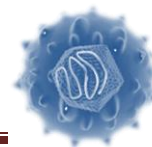
vía de la COX así como sus funciones, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Greenhough, Smartt et al. 2009).

Koch y Bartenschlager *et al.* y Neddermann *et al.* reportaron que existe una interacción entre las proteínas no-estructurales del VHC para permitir el desarrollo del ciclo de replicación viral, sin embargo se desconoce cuál es la relación exacta entre cada una de ellas.

Un aspecto notable de este estudio es la utilización de 2 líneas celulares, una derivada de hepatocarcinoma de humano, HuH-7 y HepG2, línea celular derivada de hepatoblastoma. Se han reportado diferencias en la expresión de ciertos receptores de membrana necesarios para la infección por parte del VHC. Dentro de la progresión de la enfermedad, existen casos en los que se presenta una resolución de la enfermedad de manera espontánea (entre el 15-20 %) sin embargo más del 80% desarrolla una cronicidad de la enfermedad progresando de fibrosis a cirrosis y finalmente el 4% de las personas que sobreviven hasta éste estado pueden llegar a presentar CHC, por lo que es importante investigar cuáles son los factores por los cuales se presenta este tipo de resolución, las diferencias entre un paciente y otro que permitan la eliminación del virus, es por eso que se determinó el uso de éstas 2 líneas celulares, una permisiva para la infección por el VHC (HuH-7) y otra no permisiva (HepG2).

En nuestro estudio, se llevó a cabo la transfección pFK1 a fin de expresar las proteínas no-estructurales del VHC en las dos líneas celulares antesmencionadas, y co-transfección con pCOX-2, que expresa la proteína COX-2, resultando en una sobreexpresión de COX-2 en células HuH-7, cuando se realiza la co-transfección, incrementándose los niveles de ARN-COX2 y ARN-VHC, lo que sugiere que la presencia de las proteínas virales inducen la sobreexpresión de COX-2, lo que concuerda con lo reportado con Núñez, *et al* y Waris *et al* en donde reportan que la activación de COX-2 e inducción de PGE₂ por el replicón subgenómico de VHC involucra estrés oxidativo y la activación de NF-κB.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2

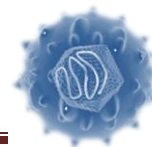


Sin embargo a nivel de proteína, al co-transfectar células HuH-7 con 0.2 μg pFK1 se incrementa la proteína COX-2, pero al co-transfectar con una mayor cantidad de plásmido, 0.5 μg pFK1, el nivel de proteína COX-2 disminuye con respecto al control; esto puede explicarse al presentarse una saturación en el RE por parte de la sobreexpresión de proteínas virales no-plegadas que disminuya la expresión de COX-2.

En comparación con la línea celular no-permisiva HepG2, se ha reportado una sobreexpresión de COX-2 (Liu, Peng et al. 2005), aun y cuando se presenta un incremento a nivel de proteína-COX-2 éste es dosis-dependiente al plásmido pCOX-2; se incrementaron los niveles de ARN-COX-2, sin embargo hay un decremento en el ARN-VHC, por lo que al parecer las proteínas no-estructurales, en HepG2, su expresión no se ve relacionada con la sobreexpresión de COX-2, por lo que es evidente la capacidad de respuesta de las células no-permisivas a la infección es distinta en presencia ARN viral.

Al realizar los ensayos de co-transfección utilizando el plásmido que codifica para la proteína no estructural NS5A se observó un incremento en el nivel de ARN-NS5A, ARN-COX-2 y de la proteína COX-2 de manera dosis dependiente en ambas líneas celulares HuH-7 y HepG2, lo que concuerda con lo encontrado por Núñez *et al.* en 2003, quienes reportaron un sinergismo en la expresión de COX-2 y la proteína viral NS5A de manera dosis dependiente, al igual que con la proteína Core; sin embargo el nivel de expresión a nivel de proteína en HepG2 fue disminuida, por lo que pudiera ser que en HepG2 la proteína no-estructural NS5A pudiera no mediar la activación de COX-2 de manera directa.

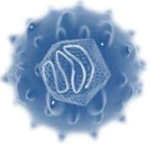
Okuda, *et al.* y Gong, *et al.*, reportaron que las proteínas virales core y NS5A son capaces de activar diferentes factores de transcripción como NF κ B, AP-1, SRE, y STAT-3, sugiriendo su potencial en la sobreexpresión de COX-2, por lo que es necesaria la evaluación de la activación de estas proteínas para determinar cuáles son las vías que están siendo activadas o silenciadas con la interacción con COX-2.



La acumulación de las glicoproteínas de la envoltura del VHC en el ER induce la UPR (Unfolded Protein Response). Las glicoproteínas de envoltura también son capaces de regular positivamente la expresión de COX-2, lo que sugiere un posible papel patogénico de las glicoproteínas de envoltura en los procesos de fibrosis y en la carcinogénesis.

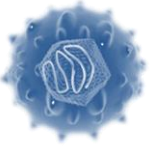
El nivel de expresión de COX-2 en HepG2 fue superior que en HuH-7. Lo que nos indica que puede haber otras vías de señalización activadas en HepG2 que permitan la sobreexpresión de las proteínas E2 y COX-2 en el RE, así como también puede haber una degradación de la COX-2 hacia proteosoma como respuesta de las proteínas no-plegadas en el RE. Sin embargo esta respuesta en HuH-7 concuerda con lo reportado por Chan *et al* en 2009, en donde no se observó una activación en la sobreexpresión de COX-2 en la línea HuH-7 al ser transfectada con las glicoproteínas de envoltura E1 y E2 de manera individual.

Sin embargo, el efecto global de la infección por VHC en la expresión COX-2 dependerá de la interacción de varias proteínas virales, como la proteína CORE, las proteínas NS3 y NS5A se ha demostrado que sobre y sub regula la expresión de COX-2.



CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES

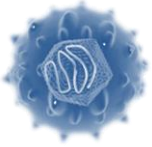
- COX-2 se sobreexpresa en las líneas HuH-7 y HepG2 en presencia de ARN viral y puede desempeñar un papel clave en la proliferación de células tumorales y la carcinogénesis.
- Existe una expresión diferencial de la enzima COX-2 y las proteínas virales analizadas (NS5A, E2) en las dos líneas celulares HuH-7, la cual es permisiva para la infección por VHC y en cambio no permisiva para HepG2 para soportar la infección por VHC.
- El efecto de las proteínas no estructurales del VHC al utilizar el replicón subgenómico en HuH-7 causó un incremento de la proteína COX-2 en comparación con HepG2.
- De la misma manera, la expresión de la proteína no estructural NS5A del VHC en HuH-7 causó un incremento de la proteína COX-2 en comparación con HepG2.
- La expresión de la glicoproteína de envoltura E2 del VHC en HuH-7 causó una disminución de la proteína COX-2 en comparación con HepG2, en donde se encontró incrementado a nivel de proteína.
- Se demostró que cada una de las líneas celulares regula de manera diferencial las vías de señalización de COX-2 como respuesta a la presencia del VHC, sin embargo es importante destacar que se requieren más estudios para determinar cuáles son las vías por las cuales las proteínas no-estructurales y la glicoproteína de envoltura E2 causa un efecto diferencial en HepG2 en cuanto a la activación de la COX-2.
- Esta regulación diferencial de la sobreexpresión de COX-2 en presencia de las proteínas virales nos ayuda a entender como la infección crónica por el VHC podría conducir a diferentes estadios de la enfermedad en los pacientes infectados.



CAPÍTULO X. PERSPECTIVAS

Evaluar la activación de NF κ B en HepG2 y HuH-7 en presencia de las diferentes proteínas estructurales y no-estructurales del VHC.

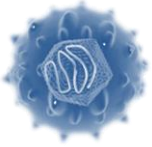
Evaluar el estado de fosforilación de NS5A (p58 kDa; p56 kDa) en la línea permisiva HuH-7 y en la no-permisiva HepG2.



CAPÍTULO XII. BIBLIOGRAFÍA

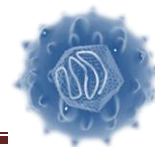
- Accioly, M. T., P. Pacheco, et al. (2008). "Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells." Cancer Res 68(6): 1732-1740.
- Adachi, T., S. Nakashima, et al. (1995). "Roles of prostaglandin production and mitogen-activated protein kinase activation in hepatocyte growth factor-mediated rat hepatocyte proliferation." Hepatology 21(6): 1668-1674.
- Agnello, V., G. Abel, et al. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 96(22): 12766-12771.
- Alter, M. J. (1997). "The epidemiology of acute and chronic hepatitis C." Clin Liver Dis 1(3): 559-568, vi-vii.
- Anderson, F. H., L. Zeng, et al. (1997). "Failure of ketoprofen and interferon combination therapy to improve interferon-resistant chronic hepatitis C." Can J Gastroenterol 11(4): 294-297.
- Andre, P., G. Perlemuter, et al. (2005). "Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism." Semin Liver Dis 25(1): 93-104.
- Andreone, P., C. Cursaro, et al. (1993). "Interferon-alpha increases prostaglandin E2 production by cultured liver biopsy in patients with chronic viral hepatitis: can non-steroidal anti-inflammatory drugs improve the therapeutic response to interferon?" J Hepatol 19(2): 228-231.
- Appleby, S. B., A. Ristimaki, et al. (1994). "Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene." Biochem J 302 (Pt 3): 723-727.
- Barth, H., T. J. Liang, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications." Hepatology 44(3): 527-535.
- Bartosch, B. and F. L. Cosset (2006). "Cell entry of hepatitis C virus." Virology 348(1): 1-12.
- Bi, N., M. Yang, et al. (2010). "Cyclooxygenase-2 genetic variants are associated with survival in unresectable locally advanced non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res 16(8): 2383-2390.
- Blanchard, E., S. Belouzard, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." J Virol 80(14): 6964-6972.
- Bogar, L. J., L. L. Bartula, et al. (1999). "Enhanced bradykinin-stimulated prostaglandin release in the acutely inflamed guinea pig gallbladder is due to new synthesis of cyclooxygenase 1 and prostacyclin synthase." J Surg Res 84(1): 71-76.
- Burdette, D., M. Olivarez, et al. (2010). "Activation of transcription factor Nrf2 by hepatitis C virus induces the cell-survival pathway." J Gen Virol 91(Pt 3): 681-690.
- Callejas, N. A., L. Bosca, et al. (2000). "Regulation of cyclooxygenase 2 expression in hepatocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins." Gastroenterology 119(2): 493-501.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



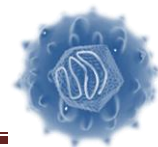
- Casado, M., N. A. Callejas, et al. (2001). "Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy." FASEB J 15(11): 2016-2018.
- Cervello, M. and G. Montalto (2006). "Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol 12(32): 5113-5121.
- Cianchi, F., C. Cortesini, et al. (2001). "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer." Gastroenterology 121(6): 1339-1347.
- Cocquerel, L., C. Voisset, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions." J Gen Virol 87(Pt 5): 1075-1084.
- Coyne, C. B. and J. M. Bergelson (2006). "Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions." Cell 124(1): 119-131.
- Charlton, M. (2001). "Hepatitis C infection in liver transplantation." Am J Transplant 1(3): 197-203.
- Chayama, K. and C. N. Hayes (2011). "Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease." J Gastroenterol Hepatol 26 Suppl 1: 83-95.
- Chen, C. Y. and A. B. Shyu (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." Trends Biochem Sci 20(11): 465-470.
- Chen, S. L. and T. R. Morgan (2006). "The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection." Int J Med Sci 3(2): 47-52.
- Cheng, A. S., H. L. Chan, et al. (2002). "Expression of cyclooxygenase-2 in chronic hepatitis B and the effects of anti-viral therapy." Aliment Pharmacol Ther 16(2): 251-260.
- Cheng, J., H. Imanishi, et al. (2002). "Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A(2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis." Hepatol Res 23(3): 185-195.
- Chiquete, E. and A. Panduro (2007). "Low prevalence of anti-hepatitis C virus antibodies in Mexico: A systematic review." Intervirology 50(1): 1-8.
- Dey, I., K. Keller, et al. (2003). "Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*." Proc Natl Acad Sci U S A 100(23): 13561-13566.
- Dinchuk, J. E., B. D. Car, et al. (1995). "Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II." Nature 378(6555): 406-409.
- Evans, M. J., T. von Hahn, et al. (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." Nature 446(7137): 801-805.
- Fernandez, M., J. C. Garcia-Pagan, et al. (1996). "Acute and chronic cyclooxygenase blockage in portal-hypertensive rats: influence in nitric oxide biosynthesis." Gastroenterology 110(5): 1529-1535.
- Fuerst, T. R., E. G. Niles, et al. (1986). "Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A 83(21): 8122-8126.
- Garavito, R. M., M. G. Malkowski, et al. (2002). "The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2." Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69: 129-152.
- Giambartolomei, S., M. Artini, et al. (1999). "Nonsteroidal anti-inflammatory drug metabolism potentiates interferon alfa signaling by increasing STAT1 phosphorylation." Hepatology 30(2): 510-516.
- Giannini, C. and C. Brechot (2003). "Hepatitis C virus biology." Cell Death Differ 10 Suppl 1: S27-38.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



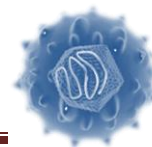
- Gibbons, D. L., M. C. Vaney, et al. (2004). "Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus." *Nature* 427(6972): 320-325.
- Graupera, M., J. C. Garcia-Pagan, et al. (2003). "Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers." *Hepatology* 37(1): 172-181.
- Graupera, M., J. C. Garcia-Pagan, et al. (2003). "Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers." *J Hepatol* 39(4): 515-521.
- Green, G. A. (2001). "Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2." *Clin Cornerstone* 3(5): 50-60.
- Greenhough, A., H. J. Smartt, et al. (2009). "The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment." *Carcinogenesis* 30(3): 377-386.
- Harris, R. C., J. A. McKanna, et al. (1994). "Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction." *J Clin Invest* 94(6): 2504-2510.
- Hassid, A. and L. Levine (1977). "Induction of fatty acid cyclooxygenase activity in canine kidney cells (MDCK) by benzo(a)pyrene." *J Biol Chem* 252(19): 6591-6593.
- Hla, T. and K. Neilson (1992). "Human cyclooxygenase-2 cDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16): 7384-7388.
- Hu, K. Q., C. H. Yu, et al. (2003). "Inhibited proliferation of cyclooxygenase-2 expressing human hepatoma cells by NS-398, a selective COX-2 inhibitor." *Int J Oncol* 22(4): 757-763.
- Jarving, R., I. Jarving, et al. (2004). "On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isozymes: characterization of marine invertebrate COX genes points to independent duplication events in vertebrate and invertebrate lineages." *J Biol Chem* 279(14): 13624-13633.
- Johnston, D. E. and C. Kroening (1996). "Stimulation of prostaglandin synthesis in cultured liver cells by CCl4." *Hepatology* 24(3): 677-684.
- Jones, D. A., D. P. Carlton, et al. (1993). "Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines." *J Biol Chem* 268(12): 9049-9054.
- Kapicioglu, S., M. Sari, et al. (2000). "The effect of indomethacin on hepatitis B virus replication in chronic healthy carriers." *Scand J Gastroenterol* 35(9): 957-959.
- Kaufmann, W. E., P. F. Worley, et al. (1996). "COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2317-2321.
- Kim, S. F., D. A. Huri, et al. (2005). "Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2." *Science* 310(5756): 1966-1970.
- Koga, H., S. Sakisaka, et al. (1999). "Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation." *Hepatology* 29(3): 688-696.
- Kondo, M., H. Yamamoto, et al. (1999). "Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease-free survival in patients with hepatocellular carcinoma." *Clin Cancer Res* 5(12): 4005-4012.
- Kordes, U., D. Krappmann, et al. (2000). "Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells." *Leukemia* 14(3): 399-402.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, et al. (2006). "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." *J Virol* 80(11): 5308-5320.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



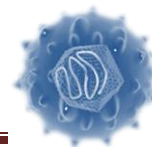
- Kraemer, S. A., E. A. Meade, et al. (1992). "Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences." Arch Biochem Biophys 293(2): 391-400.
- Kuhn, R. J., W. Zhang, et al. (2002). "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." Cell 108(5): 717-725.
- Langenbach, R., C. Loftin, et al. (1999). "Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions." Biochem Pharmacol 58(8): 1237-1246.
- Lara-Pezzi, E., M. V. Gomez-Gaviro, et al. (2002). "The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression." J Clin Invest 110(12): 1831-1838.
- Liou, J. Y., N. Aleksic, et al. (2005). "Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance." Exp Cell Res 306(1): 75-84.
- Liu, N. B., T. Peng, et al. (2005). "Overexpression of cyclooxygenase-2 in human HepG2, Bel-7402 and SMMC-7721 hepatoma cell lines and mechanism of cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib-induced cell growth inhibition and apoptosis." World J Gastroenterol 11(40): 6281-6287.
- Luong, C., A. Miller, et al. (1996). "Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2." Nat Struct Biol 3(11): 927-933.
- Masferrer, J. L., K. M. Leahy, et al. (2000). "Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors." Cancer Res 60(5): 1306-1311.
- Mbonye, U. R., M. Wada, et al. (2006). "The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system." J Biol Chem 281(47): 35770-35778.
- Modis, Y., S. Ogata, et al. (2004). "Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion." Nature 427(6972): 313-319.
- Moradpour, D., F. Penin, et al. (2007). "Replication of hepatitis C virus." Nat Rev Microbiol 5(6): 453-463.
- Morinaga, S., Y. Yamamoto, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2 mRNA is up-regulated in cirrhotic or chronic hepatitis liver adjacent to hepatocellular carcinoma." J Gastroenterol Hepatol 17(10): 1110-1116.
- Morita, I., M. Schindler, et al. (1995). "Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2." J Biol Chem 270(18): 10902-10908.
- Neumann, A. U., N. P. Lam, et al. (1998). "Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy." Science 282(5386): 103-107.
- Nunez Martinez, O., G. Clemente Ricote, et al. (2003). "[Role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of chronic liver diseases]." Med Clin (Barc) 121(19): 743-748.
- Nunez, O., A. Fernandez-Martinez, et al. (2004). "Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins." Gut 53(11): 1665-1672.
- Ohuchi, K. and L. Levine (1978). "Stimulation of prostaglandin synthesis by tumor-promoting phorbol-12, 13-diesters in canine kidney (MDCK) cells. Cycloheximide inhibits the stimulated prostaglandin synthesis, deacylation of lipids, and morphological changes." J Biol Chem 253(13): 4783-4790.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2

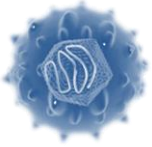


- Ota, S., H. Bamba, et al. (2002). "Review article: COX-2, prostanoids and colon cancer." Aliment Pharmacol Ther 16 Suppl 2: 102-106.
- Otto, J. C., D. L. DeWitt, et al. (1993). "N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem 268(24): 18234-18242.
- Otto, J. C. and W. L. Smith (1995). "Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2." J Lipid Mediat Cell Signal 12(2-3): 139-156.
- Palayoor, S. T., M. Y. Youmell, et al. (1999). "Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen." Oncogene 18(51): 7389-7394.
- Panduro, A., G. E. Melendez, et al. (2011). "[Epidemiology of viral hepatitis in Mexico]." Salud Publica Mex 53 Suppl 1: S37-45.
- Panduro, A., S. Roman, et al. (2010). "Molecular epidemiology of hepatitis C virus genotypes in west Mexico." Virus Res 151(1): 19-25.
- Pikarsky, E., R. M. Porat, et al. (2004). "NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer." Nature 431(7007): 461-466.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." Science 282(5390): 938-941.
- Pong, S. S., S. L. Hong, et al. (1977). "Prostaglandin production by methylcholanthrene-transformed mouse BALB/3T3. Requirement for protein synthesis." J Biol Chem 252(4): 1408-1413.
- Ristimaki, A., S. Garfinkel, et al. (1994). "Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation." J Biol Chem 269(16): 11769-11775.
- Rizzo, M. T. (2011). "Cyclooxygenase-2 in oncogenesis." Clin Chim Acta 412(9-10): 671-687.
- Rockey, D. C. (2003). "Vascular mediators in the injured liver." Hepatology 37(1): 4-12.
- Roos, K. L. and D. L. Simmons (2005). "Cyclooxygenase variants: the role of alternative splicing." Biochem Biophys Res Commun 338(1): 62-69.
- Rudnick, D. A., D. H. Perlmutter, et al. (2001). "Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8885-8890.
- Saludes, V., M. A. Bracho, et al. (2010). "Baseline prediction of combination therapy outcome in hepatitis C virus 1b infected patients by discriminant analysis using viral and host factors." PLoS One 5(11): e14132.
- Sarfraz, S., S. Hamid, et al. (2008). "Altered expression of cell cycle and apoptotic proteins in chronic hepatitis C virus infection." BMC Microbiol 8: 133.
- Scarselli, E., H. Ansuini, et al. (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." EMBO J 21(19): 5017-5025.
- Seibert, K., Y. Zhang, et al. (1994). "Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain." Proc Natl Acad Sci U S A 91(25): 12013-12017.
- Sevigny, M. B., C. F. Li, et al. (2006). "Glycosylation regulates turnover of cyclooxygenase-2." FEBS Lett 580(28-29): 6533-6536.
- Shiota, G., M. Okubo, et al. (1999). "Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma." Hepatogastroenterology 46(25): 407-412.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



- Simmonds, P., J. Bukh, et al. (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." *Hepatology* 42(4): 962-973.
- Sitzmann, J. V., G. B. Bulkley, et al. (1989). "Role of prostacyclin in the splanchnic hyperemia contributing to portal hypertension." *Ann Surg* 209(3): 322-327.
- Sobolewski, C., C. Cerella, et al. (2010). "The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies." *Int J Cell Biol* 2010: 215158.
- Strathdee, S. A., W. D. Fraga, et al. (2005). ""Vivo para consumirla y la consumo para vivir" ["I live to inject and inject to live"]: high-risk injection behaviors in Tijuana, Mexico." *J Urban Health* 82(3 Suppl 4): iv58-73.
- Sy, T. and M. M. Jamal (2006). "Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection." *Int J Med Sci* 3(2): 41-46.
- Tai, D. I., S. L. Tsai, et al. (2000). "Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis." *Hepatology* 31(3): 656-664.
- Tardif, K. D., G. Waris, et al. (2005). "Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress." *Trends Microbiol* 13(4): 159-163.
- Tazawa, R., X. M. Xu, et al. (1994). "Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene." *Biochem Biophys Res Commun* 203(1): 190-199.
- Tscherne, D. M., C. T. Jones, et al. (2006). "Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry." *J Virol* 80(4): 1734-1741.
- Tsujii, H., Y. Okamoto, et al. (1993). "Prostaglandin E2 and rat liver regeneration." *Gastroenterology* 105(2): 495-499.
- Tsujii, M. and R. N. DuBois (1995). "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2." *Cell* 83(3): 493-501.
- Ueda, N., R. Yamashita, et al. (1997). "Induction of cyclooxygenase-1 in a human megakaryoblastic cell line (CMK) differentiated by phorbol ester." *Biochim Biophys Acta* 1344(1): 103-110.
- Volkow, P., S. R. Velasco, et al. (2004). "Transfusion-associated HIV infection in Mexico related to paid blood donors; HIV epidemic." *Int J STD AIDS* 15(5): 337-342.
- Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." *Nat Med* 11(7): 791-796.
- Wang, D., H. Wang, et al. (2004). "Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta." *Cancer Cell* 6(3): 285-295.
- Waris, G. and A. Siddiqui (2005). "Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication." *J Virol* 79(15): 9725-9734.
- Wasley, A. and M. J. Alter (2000). "Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends." *Semin Liver Dis* 20(1): 1-16.
- Williams, C. S., M. Mann, et al. (1999). "The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development." *Oncogene* 18(55): 7908-7916.
- Williams, C. S., M. Tsujii, et al. (2000). "Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth." *J Clin Invest* 105(11): 1589-1594.
- Williams, R. (2006). "Global challenges in liver disease." *Hepatology* 44(3): 521-526.



- Wu, Y. P., S. S. Li, et al. (1991). "Modulation of splanchnic vascular sensitivity to angiotensin II." *Surgery* 110(2): 162-168.
- Yokoyama, Y., H. Xu, et al. (2003). "Role of thromboxane A2 in early BDL-induced portal hypertension." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(3): G453-460.
- Zarski, J. P., M. Maynard-Muet, et al. (1998). "Tenoxicam, a non-steroid anti-inflammatory drug, is unable to increase the response rate in patients with chronic hepatitis C treated by alpha interferon." *Hepatology* 27(3): 862-867.

CAPÍTULO XIII. ANEXOS

CULTIVO CELULAR

1. SUPLEMENTO DE MEDIO DE CULTIVO

Material

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

Equipo

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

Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM).

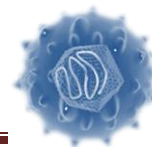
Reactivos

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

Protocolo

- Medio suplementado con 2% de SBF para mantenimiento de células HuH-7.

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



Se debe manejar el medio de cultivo dentro de la campana de flujo laminar. Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 2% se añadirán 10 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de amino ácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de *L*- glutamina (100X).

2. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.

Material

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

Reactivos

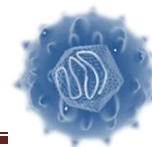
- Medio de cultivo Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X estéril.
- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. Marca GIBCO. Cat. 15050057.

Equipo

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

Protocolo para células HuH-7 y HepG2.

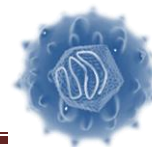
1. Retirar el medio de cultivo de la botella con células confluentes por aspiración.
2. Lavar las células con una alícuota de PBS estéril 1X. por cada 25 cm² de superficie se debe emplear 1 mL de buffer de lavado. Realizar movimientos circulares para permitir que la solución entre en contacto con todas las unidades de la monocapa y pueda remover la mayor cantidad posible de detrito celular. Retirar el PBS 1X por aspiración.



3. Añadir tripsina. Se utilizará 1 mL de tripsina en una botella de 25 cm² y 3 mL para botellas de 75 cm².
4. Incubar a 37°C durante 5 minutos. Procurar no exceder el tiempo para que la enzima no comience a degradar la membrana celular.
5. Neutralizar la actividad de la tripsina adicionando un volumen 1:1 de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal.
6. Recolectar la suspensión celular en un tubo falcon de 15 mL.
7. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Cuidadosamente retirar el medio de cultivo utilizado para neutralizar la tripsina.
9. Añadir medio de cultivo nuevo dependiendo del tamaño del botón celular obtenido. Se puede utilizar 2 mL para resuspender el botón celular obtenido a partir de una botella semiconfluyente de 25 cm²; mientras que un botón celular proveniente de una botella semiconfluyente de 75 cm² se puede resuspender en 3 ó 4 mL de medio.
10. Resuspender completamente con ayuda de una pipeta de 2 mL (o con una puntilla de 1000 µL) el botón celular en el medio nuevo hasta observar que no hay cúmulos flotando.
11. Tomar de la suspensión de células la alícuota necesaria y colocarla en una botella que cuenta con la cantidad de medio nuevo correspondiente. (5 mL a botella de 25 cm² y 9 mL de 75 cm²)
12. Colocar la botella en la incubadora a 37 °C con 5% CO₂.

Observaciones

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



3. RECuento CELULAR

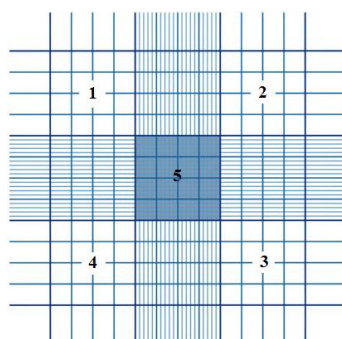


Fig A. Esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer.

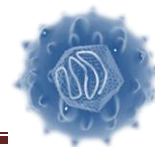
Para facilitar el recuento de células viables se utiliza un colorante vital, el azul tripano. Las células vivas captarán el colorante pero lo expelerán al medio, mientras que las células muertas lo mantendrán en su interior. Generalmente se preparan diluciones 1:4 o 1:8 de la suspensión celular a contabilizar.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

Material

- Tubos eppendorf de 0.6 mL.
- Cultivos de células HuH-7 ó HepG2.

Reactivos

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



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

Equipo

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

Protocolo

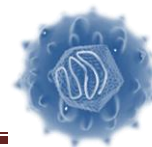
1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión (el volumen dependerá del botón celular obtenido) y disgregación en medio nuevo de las células.
2. Hacer la siguiente dilución como sigue en tubo de 600 µL:

Reactivo	Cantidad de reactivo a tomar (µL) (dilución 1:8)
Células en suspensión	10
Colorante Azul de tripano	10
Medio de Cultivo	60

*Procurar homogenizar completamente antes de realizar la medición, puesto que de forma natural las células precipitan volviendo a formar el botón al fondo del tubo donde se centrifugaron.

3. Mezclar con ayuda de una puntilla de 200 µL el volumen del tubo, subiendo y bajando su contenido sin formar burbujas.
4. Depositar 10 µL de la suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.
5. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas de 4 x 4 de la cámara (Figura A, números 1, 2, 3 y 4). Registrar los números.
6. Contar el número de células en el cuadrante central de 5 x 5 (Figura A, número 5). Registrar la cantidad. (El número obtenido con el promedio de las cuadrículas de 4 x 4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5 x 5)
7. Realizar el cálculo del total de células empleando la siguiente fórmula:

$$\text{No. células/mL} = (\text{Promedio } 4 \times 4) (\text{Factor de dilución}) (1 \times 10^4)$$



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

4. CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Material

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

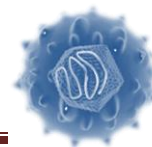
Reactivos

- Suero bovino fetal. HuH-7 y HepG2. Marca GIBCO.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grado Biología molecular. 100 mL. Marca Sigma. Cat. D2650.
- Hielo.

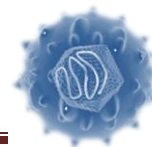
Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de presión y vacío.
- Centrífuga.
- Hielera.
- Refrigerador de -20 – 0 °C.
- Ultracongelador Revco.
- Contenedor para congelación, “Mr. Frosty” Nalgene®

Protocolo para células HuH-7 y HepG2.



1. Preparar crioviales a congelar. Etiquetar cada uno para evitar exposición de células en DMSO a temperatura ambiente.
2. Cosechar células HuH-7 y HepG2 siguiendo el protocolo de subcultivo hasta la obtención del botón celular.
3. Remover completamente el medio utilizado para neutralizar la tripsina, empleando una micropipeta de 1000 μL y procurando no romper el botón celular.
4. Resuspender células en suero bovino fetal completo. Añadir tanto suero como sea necesario para obtener una suspensión con una concentración final de 1.5 a 2 millones de células por mL (tomando en cuenta que se tomarán 900 μL para cada vial).
5. Depositar en cada criovial 100 μL de DMSO. No flamear después de colocar el disolvente.
6. Depositar en cada vial 900 μL de la suspensión de células en suero bovino fetal.
7. Almacenar células en hielo (4 $^{\circ}\text{C}$) mientras se colocan en Mr. Frosty, el cual se encuentra a temperatura ambiente.
8. Transfrir crioviales al contenedor Mr. Frosty
9. Transferir células a ultracongelador Revco a -80 $^{\circ}\text{C}$. Las células congeladas y almacenadas a esta temperatura tienen caducidad de un año.



5. DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Material

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

Reactivos

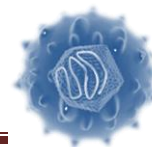
- Medio de cultivo. HuH-7 y HepG2: Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.

Equipo

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

Protocolo

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



6. Incubar botella de cultivo a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂.

VIRUS VACCINIA

6. PREPARACIÓN DE VIRUS VACCINIA

Material

- Cultivos celulares HeLa (VPH 18+)
- Micropipetas.
- Recipiente para desechos biológicos
- Botellas para cultivo celular de 75 cm². Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641
- Tubos falcón de 15 mL Marca Corning. Cat. 430053.

Reactivos

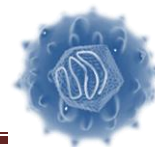
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X estéril.
- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL Marca GIBCO. Cat. 15050057.
- Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Cloro 10%

Equipo

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

Protocolo

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



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

Preparación de Soluciones

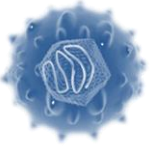
PBS 1X

Reactivos	Cantidad (g)	[Final] %
NaCl	80	8
KCl	2	0.2
Na₂HPO₄	14.4	1.22
KH₂PO₄	2.4	0.24

Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 L con agua MiliQ. Esterilizar solución

Observaciones:

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



- Lavarse las manos antes y después de trabajar con el virus vaccinia.
- Colocar las puntillas en un recipiente para desechos biológicos o en cloro al 10%.
- Agregar cloro al 10% a las botellas en donde se realizó la infección.
- Una vez descongelado el vial de vaccinia, se puede almacenar a 4°C para su uso, evitar procesos de congelación y descongelación ya que puede afectar la estabilidad del virus.

7. EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO DEL VIRUS VACCINIA

Material

Cultivo celular.

Micropipetas.

Recipiente para desechos biológicos

Placas para cultivo celular de 6 pozos.
(35mm x 10 mm)

Reactivos

Solución buffer salino de fosfatos (PBS)
1X estéril.

Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. Marca
GIBCO. Cat. 15050057.

Advanced DMEM suplementado al 2%
con suero bovino fetal.

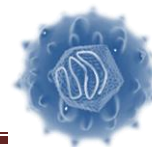
Cloro 10%

Equipo

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

Protocolo

1. Sembrar 2×10^5 células en cada pozo de una placa de 6 pozos.
2. 24 h después retirar el medio y adicionar 1 mL de medio ADMEM suplementado con diferentes cantidades del stock del virus vaccinia (10, 20, 40 y 80 μ L).
3. Incubar la placa a 37 °C por 2 h.
4. 2 horas después de la infección adicionar 1 mL de medio ADMEM suplementado a cada pozo.
5. Observar al microscopio el efecto citopático a las 24, 48 y 72 horas después de la infección.



Observaciones

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

PROTEÍNAS

8. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Material

- Cultivos celulares
- Buffer de Lisis 1X
- Tableta de inhibidores de proteasas marca Roche # 1697498
- Escrapers de 25 cm marca Corning # 3010

Equipo

- Centrífuga refrigerada

Preparación de soluciones

PBS 1X

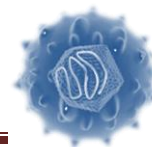
Reactivos	Cantidad (g)	[Final] %
NaCl	80	8
KCl	2	0.2
Na ₂ HPO ₄	14.4	1.22
KH ₂ PO ₄	2.4	0.24

Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 L con agua MiliQ. Esterilizar solución

PBS 1X + EDTA 1 mM (Buffer de raspado)

Reactivos	Cantidad	[Final]
-----------	----------	---------

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



PBS 10X	10 mL	1 X
EDTA 0.5 M pH 8	200 μ L	1 mM

Ajustar a 100 mL con agua MiliQ.

Buffer de Lisis 5X

Reactivo	Cantidad	[Final]
Tritón X-100	5 mL	50 mM
Tris-HCl 1 M pH= 7.5	5 mL	1 M
MgCl₂ 1 M	1 mL	1 M
KCl 2 M	12.5 mL	2 M

Aforar a 100 mL con agua MilliQ. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de lisis (para 500 μ L)

Reactivo	Cantidad
Buffer 5 X	100 μ l
DTT*	1 μ l
PMSF**	1 μ l
Agua milliQ	378 μ l
“complete” *Inhibidor de proteasas	20 μ l

Almacenar a -20 °C, tiene caducidad de 15 días

*Almacenar a -20 °C. ** Almacenar a 4 °C.

Tris-HCl pH 7.5 1 M

Reactivo	Cantidad	[Final]
Tris	12.11 g	1M

Ajustar pH a 7.5 con HCl y aforar a 100 mL con agua MilliQ

KCl 2 M

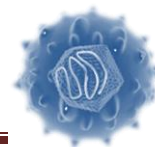
Reactivo	Cantidad	[Final]
KCl	14.91 g	2 M

Aforar a 100 mL con agua MilliQ

MgCl₂ 1 M

Reactivo	Cantidad	[Final]
----------	----------	---------

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



MgCl₂	4.76 g	1 M
-------------------------	--------	-----

Aforar a 50 mL con agua MilliQ

PMSF 0.5 M

Reactivo	Cantidad	[Final]
PMSF	0.0871 g	0.5 M

Disolver en 1 mL de DMSO.

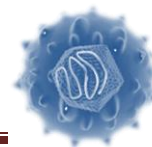
Inhibidor de proteasas “complete”

Contenido:

Protease Inhibitors Set Cat. No. 11 206 893 001

Inhibitors included in the set	Specificity of inhibition	Quantity Supplied
Antipain-dihydrochloride	Papain, Trypsin, Cathepsin A and B	3 mg
Aprotinin	Trypsin, Plasmin, Chymotrypsin, Kallikrein	0.5 mg
Bestatin	Aminopeptidases	0.5 mg
Chymostatin	α -, β -, γ -, δ -Chymotrypsin	1 mg
E-64	Cysteine Proteases	3 mg
EDTA-Na ₂	Metalloproteases	10 mg
Leupeptin	Serine and Cysteine Proteases such as Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin B	0.5 mg
Pefabloc SC	Serine Proteases	20 mg
Pepstatin	Aspartic Proteases	0.5 mg
Phosphoramidon	Metalloproteinases, specifically Thermolysin	3 mg

Disolver 1 tableta en 1mL de agua MilliQ estéril.



9. MÉTODO DE BRADFORD MICROENSAYO

Fundamento

Consiste en determinar la concentración de proteína soluble. Se utiliza el reactivo de Bradford (colorante ácido) que se une a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas (principalmente arginina). Las muestras se leen a 600 nm en un espectrofotómetro.

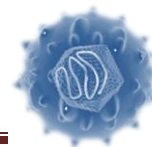
Material

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

Equipo

- Lector de ELISA ELX800

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



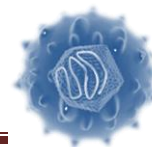
Protocolo

1. Preparar una solución stock de 0.1 g/mL de BSA en agua MilliQ estéril.
2. Tomar 10 μL de la solución stock y adicionar 990 μL de agua para tener una solución a 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, a partir de ésta segunda solución hacer una última dilución, para tener una solución de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3. Realizar diluciones para los estándares de BSA:
Blanco: 160 μl de agua milliQ + 40 μl de Bradford

Estándar ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen del stock de BSA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Agua (μL)	Reactivo de Bradford (μL)	Volumen final (μL)
0	0	160	40	200
1	2	158	40	200
5	10	150	40	200
10	20	140	40	200
15	30	130	40	200
20	40	120	40	200
25	50	110	40	200
30	60	100	40	200
35	70	90	40	200
40	80	80	40	200

4. Los estándares se realizan por triplicado en placa de 96 pozos.
5. Después de mezclar cada pozo, evitando la formación de burbujas, esperar 5 minutos y leer absorbancia a 600 nm en el lector de ELISA ELX800.
6. Construir curva en Excel donde el eje de las abscisas corresponde a la concentración y el de las ordenadas a la absorbancia. Para cuantificar muestras, dependiendo del tamaño del botón celular obtenido y del volumen de buffer de lisis en el que se resuspendió, se recomienda trabajar con una dilución de 1:4 ó 1:5 y adicionar al pozo:
 - 159 μl de Agua
 - 1 μl de la muestra
 - 40 μl de Bradford.



7. Calcular la concentración final de las muestras a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración y después utilizar la siguiente fórmula:
(Concentración de la muestra)*(factor de dilución:200)/1000 = $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Fundamento

Fue descrito por LaemmLi en 1970. Las proteínas son desnaturizadas con calor y con agentes desnaturizantes tales como β -mercaptoetanol (destruye los puentes disulfuro) y SDS (desnatura y recubre a la proteína con cargas netas negativas). Las proteínas son separadas en base a su tamaño.

Material

- Proteínas cuantificadas y desnaturizadas
- Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #161-0374 de BIORAD.

Equipo

- Cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN 3 Cell marca BIORAD # 165-3322
- Fuente de poder. Power Pac1000 (Bio-Rad)

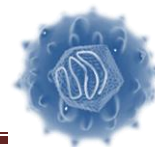
PROTOCOLO

1. Ensamblar el cassette del gel conforme a las especificaciones de la compañía BIORAD (Mini-PROTEAN 3 Cell).
2. Preparar la solución del gel separador (12%) y el gel concentrador (5%), sin adicionar PSA hasta cuando ya se vaya a realizar el gel.

Gel Separador (12%)

Gel concentrador (5%)

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



REACTIVO	VOLUMEN
Agua destilada	4.02 mL
Buffer de fosfatos pH= 8.8	2.5 mL
Poliacrilamida	3.33 mL
SDS 10%	0.1 mL
TEMED	10 μ L
PSA	50 μ L
Vol. Final	10.010 mL

REACTIVO	VOLUMEN
Agua destilada	3.05 mL
Buffer de fosfatos pH= 6.8	1.25 mL
Poliacrilamida	0.65 mL
SDS 10%	0.05 mL
TEMED	10 μ l
PSA	25 μ l
Vol. Final	5.11 mL

3. Aplicar con una pipeta serológica \approx 4.5 mL de la solución del gel separador 12% (previamente haber añadido el PSA) al vidrio que contiene el separador de 1 m, y cubrir el gel con isopropanol absoluto para favorecer la polimerización. Después de aproximadamente 15 min invertir el gel para remover el isopropanol.
4. Añadir el gel concentrador 5% (previamente haber añadido el PSA) hasta el límite del vidrio e inmediatamente colocar el peine. Esperar aproximadamente 15 min a que polimerice el gel concentrador.
5. Colocar el gel en la cámara de corrimiento y ensamblarlo. Añadir el buffer de corrida 1X hasta cubrir el gel.
6. Cargar las muestras que previamente deben ser mezcladas con buffer de carga 4X, en relación 1:1, y calentadas a 95°C por 5 minutos.
7. Correr el gel a 80V por aproximadamente 2.5 h.

Preparación de soluciones

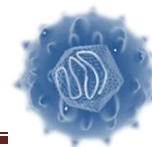
Buffer de carga (desnaturalizante) 4X

REACTIVO	VOLUMEN
Mercaptoetanol	0.5 mL
SDS 10%	1 g
Tris-HCl 1mM pH 6.8	6.5 mL
Glicerol 100%	10 mL
Azul de Bromofenol	0.05 g
Agua milliQ	Ajustar a 25 mL

Diluir las muestras 1:4 con el buffer y calentarlas a 95°C por 5 min. Almacenar el buffer de desnaturalización a 4°C.

Acrilamida/Bisacrilamida

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



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

Aforar a 300 mL con agua destilada, almacenar a 4°C y proteger la solución de la luz.

SDS 10% (p/v)

REACTIVO	Cantidad
SDS 10%	10 g

Aforar a 100 mL con agua MilliQ. El SDS es tóxico, por lo que se recomienda usar cubrebocas para pesarlo y prepararlo.

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (buffer separador)

REACTIVO	Cantidad
Tris base	181.71 g
SDS	4 g

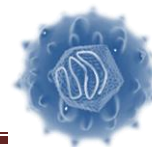
Ajustar el pH a 8.8 con HCl y aforar a 1 L con agua MilliQ.

Tris-HCl 1.5 M pH 6.8 (buffer concentrador)

REACTIVO	Cantidad
Tris base	60.57 g
SDS	4 g

Ajustar el pH a 6.8 con HCl y aforar a 1 L con agua MilliQ

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



Buffer de corrida 5X

REACTIVO	CANTIDAD	[FINAL]
Tris base	15.14 g	125 mM
Glicina	94 g	1.25 mM
SDS	5 g	0.5 %

Aforar a 1 L con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Persulfato de Amonio (PSA) 10%

REACTIVO	CANTIDAD
PSA	100 mg

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

11. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

Soluciones:

Buffer de Transferencia 5X

Reactivo	Concentración	Pesar
Glicina	0.29 %	14.5 g
Tris Base	0.58 %	29 g
Metanol	20 %	200 mL

Para preparar 1 L de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar con agua destilada, almacenar a temperatura ambiente.

PBS 10X

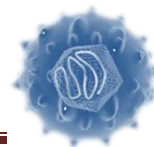
Reactivo	Concentración	Pesar
NaCl	8 %	80 g
KCl	0.2 %	2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 %	14.4 g
KH ₂ PO ₄	0.24 %	2.4 g

Ajustar pH= 7.4 con HCl y aforar a 1 l con agua.

Buffer de Bloqueo

Reactivo	Concentración	Pesar
Leche descremada en polvo	3 %	15 g

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



PBS 10x	1x	50 mL
Tritón x-100 (100%)	0.5 %	2.5 mL
Azida de Sodio	0.02 %	0.1 g

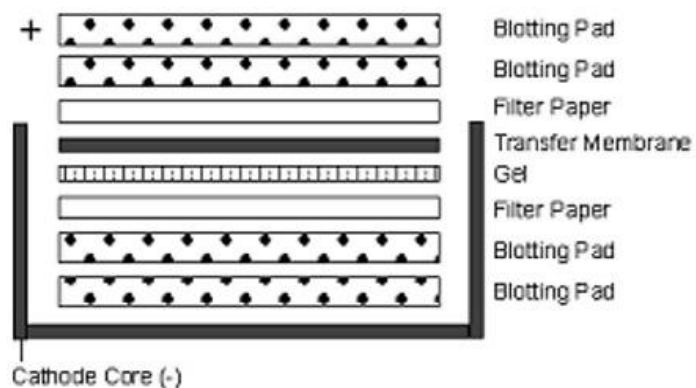
Para preparar 500 mL de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar a 500 mL con agua.

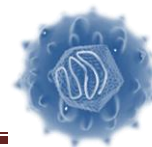
Buffer de dilución para el anticuerpo

Reactivo	Concentración	Medir (500 mL Vf)	Medir (50 mL Vf)
Leche descremada en polvo	5 %	25 g	2.5g
PBS 10x	1x	50 mL	5 mL
Tritón x-100 (100 %)	0.5 %	2.5 mL	0.25 g

Para preparar 50 mL de buffer, pesar las cantidades correspondientes y aforar a 50 mL con agua.

Para llevar a cabo la electrotransferencia seguir el siguiente esquema:





PROTOCOLOS PARA MANEJO DE RNA

12. EXTRACCIÓN DE RNA.

Material

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.
- Pipetas automáticas.

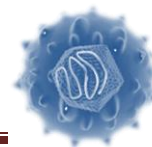
Reactivos

- TRIzol.
- Cloroformo. 500 mL. Sigma-Aldrich. Cat. 2432-500mL.
- Isopropanol.
- Etanol al 70% en agua DEPC.
- Agua DEPC.

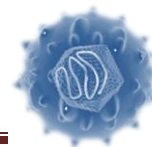
Equipo

- Centrífuga refrigerada.
- Campana de flujo laminar.

Protocolo



1. Remover medio por aspiración de la botella o los pozos de la placa de cultivo. No hacer lavado con PBS.
2. Fase de homogenización: Adicionar 1 mL de TRIzol a una botella de 25 cm² para su lisis. En el caso de hacer la extracción de RNA a un extracto viral, usar una proporción 1:1 volumen, La adición del TRIzol debe hacerse a 4°C.
3. Fase de separación: Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
4. Transferir la mezcla de TRIzol a un tubo eppendorf de 2 mL.
5. Añadir 40 µL de cloroformo frío por cada 200 µL de TRIzol empleados. Mezclar por inversión 15 segundos.
6. Incubar el tubo en hielo de 2 a 3 minutos.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
8. Fase de precipitación: Recuperar la fase acuosa y adicionarle 500 µL de isopropanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Incubar a -80°C durante una hora o toda la noche.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
11. Fase de lavado: Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado. Mezclar con vórtex.
12. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
13. Fase de resuspensión: Retirar etanol sin tocar la pastilla con la puntilla.
14. Dar un pequeño spin a temperatura ambiente para poder eliminar los restos de etanol en el tubo con ayuda de una puntilla de 10 µL.
15. Resuspender la pastilla en 36 µL de agua DEPC con 1 µL de inhibidor de RNAasas (RNAout o RNAsin) (11.7 µL de agua DEPC + 0.3 µL RNAsa out / por cada tubo).



13. SÍNTESIS DE cDNA (RETROTRANSCRIPCIÓN).

Fundamento

En la reacción de retrotranscripción, se sintetiza cDNA (DNA complementario) a partir del RNA por acción de la enzima retrotranscriptasa reversa. En este protocolo la enzima empleada es la MMLV (Molones Murine Leucemia Virus), obtenida de forma recombinante y purificada a partir de *E. coli*. Posee actividad 5'-3' ribonucleasa H, la cual permite alargar las cadenas de cDNA hasta una longitud mayor a 7 Kb.

Material

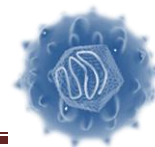
- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

Reactivos

- Buffer RT 5X
- Random primers 0.02 mg/mL
- DTT 0.01 M
- dNTPs 10 mM
- Inhibidor de RNAsas 40 U/mL
- Agua mili Q tratada con DEPC

Equipo

Evaluación del efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2



- Pipetas automáticas.
- Termociclador. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.

Protocolo

1. Colocar en un tubo eppendorf de 0.2 mL 1 μ L de random primers, 3 μ L de RNA y 7.5 μ L de agua DEPC.
2. Colocar los tubos en el termociclador a 72 °C durante 10 minutos.
3. Incubar la muestra en hielo durante 3 minutos.
4. Preparar la siguiente mezcla de reacción: 4 μ L de buffer RT 5X, 2 μ L de DTT 0.1 M, 0.5 μ L de inhibidor de RNAsas y 1 μ L de dNTPs 10 mM.
5. Añadir 8 μ L de la mezcla de reacción al tubo que se incubó en hielo, así como 1 μ L de la enzima MMLV.
6. Colocar el tubo en el termociclador y continuar con el siguiente programa:
 - a) 10 minutos/ 25 °C.
 - b) 60 minutos/ 37 °C.
 - c) 5 minutos/ 94 °C.
 - d) 10 minutos/ 4 °C.
7. Terminando el programa del termociclador, retirar el tubo que contiene el cDNA y almacenarlo a -20°C hasta su uso.

Condiciones de reacción		Programa del termociclador		
Reactivo	Volumen	Paso	Temperatura	Tiempo
Buffer RT 5X	4 μ L	1	72 °C	10 minutos
DTT 0.1 M	2 μ L	2	25 °C	10 minutos
RNase out	0.5 μ L	3	37 °C	60 minutos
dNTPs 10 mM	1 μ L	4	94 °C	5 minutos
RT-MMLV 200U/mL	1 μ L	5	4 °C	10 minutos
Volumen total	8.5 μL			

