

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA S-ADENOSIL METIONINA
(SAM) Y SU MECANISMO DE ACCIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN GÉNICA DEL VHC**

**POR
M.C. SONIA AMELIA LOZANO SEPÚLVEDA**

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

NOVIEMBRE, 2016

EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA S-ADENOSIL METIONINA
(SAM) Y SU MECANISMO DE ACCIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN GÉNICA DEL VHC

Aprobación de la tesis:



DRA. C. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA

Directora de tesis



DRA. C. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA

Co-directora de tesis




DRA. C. PAULA CORDERO PÉREZ

Miembro de la comisión de tesis



DRA. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ

Miembro de la comisión de tesis



DRA. C. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ

Miembro de la comisión de tesis



DRA. med. RAQUEL GARZA GUAJARDO

Subdirectora de Estudios de Posgrado

*A mis papás Álvaro y Sonia,
y a mis hermanos, Brianda y Álvaro;
por ser mi ejemplo de fortaleza.*



AGRADECIMIENTOS



A la Dra. Ana, por señalarme el camino y retarme día a día, por sacar lo mejor de mí. Por abrirme las puertas de su laboratorio dos veces y por confiar en mí.

A mi comisión de tesis, Dra. Linda, Dra. Paula, Dra. Rocío y Dra. Conchita, por cada consejo, por cada lección y por dedicarme su tiempo cuando lo necesité.

Al Dr. José María Mato y a la Dra. Malu Martínez por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todo el apoyo para que este proyecto fuera posible. Gracias por su guía y sus consejos.

Al Infecto Team, por hacer de este camino algo inolvidable, por brindarme sus manos y oídos. Daniel, Tanya, Owen, Vero B., Kame, Ángel, Mayela, Iker, Eduardo, Blanca, Gabriel, Vero A. y Kari porque somos un gran equipo.

A mis compañeros de doctorado, Mario, Adriana, Carlos y Elda por todo el apoyo y porque el viaje ha sido mas divertido con ustedes.

Al laboratorio de Metabolómica, por recibirme y hacerme sentir como en casa en todo momento. A Fernando Lopitz por todo tu apoyo y por todas las risas, a Marta Varela, por inspirarme con el ejemplo. A Justyna, Marta, Lucía, Paula, Vir, Teresa, Encarni, Gotxi, Espe, David, Imanol, Pablo, Sergio y Félix, siéntanse en México, porque los llevo conmigo siempre, gracias por todos los buenos momentos. Gracias por tanta inspiración y por ser mi ejemplo de energía interminable.

A Iciar Astorqui y a su familia, por tratarme como una hija y por hacerme sentir de Bilbao de toda la vida.

A Perla por salvar a esta mexicana tan lejos de Monterrey.

A todo el departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, por el trabajo compartido día a día. A Juany, Normita, Ari, Angélica, don Lalo, Lulú y Dany.

A mis amigos, Alex, Julián, Claudia, Olivia, Flor, Gaby y Keta, por ser partícipes de mi estrés y ser mi escape en todos los momentos difíciles.

A Manuel González, por que sin ti habría colapsado mil veces, gracias por tanto. Esta tesis es como tuya.

A CONACYT por el apoyo económico brindado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	X
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología de la hepatitis C	2
1.2 Historia natural de la infección crónica por el VHC, factores de riesgo y transmisión	4
1.3 Biología Molecular del VHC.....	5
1.4 Modelos experimentales para el estudio de la replicación del VHC.....	8
1.4.1 Modelos animales (<i>in vivo</i>) para el estudio del VHC.....	9
1.4.2 Sistemas <i>in vitro</i> para el estudio del VHC.....	10
1.5 VHC y estrés oxidativo	11
1.6 Terapia actual.....	12
1.7 S-adenosil metionina	16
1.7.1 SAM como donador de grupos metilo	19
1.7.2 SAM y la síntesis de GSH	20
1.7.3 SAM como modulador del proteasoma	20
1.7.4 SAM y la señalización de IFN.....	22
II. JUSTIFICACIÓN	24
III. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo general	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	28
4.1 Material.....	28
4.1.1 Reactivos.....	28
4.1.2 Equipo	31
4.2 Métodos.....	32
4.2.1 Estrategia general	32

4.2.2	Cultivo de células y tratamiento con SAM.....	33
4.2.3	Ensayo de viabilidad celular para definir dosis no tóxica de SAM.	34
4.2.4	Ensayo dosis respuesta.	34
4.2.5	Extracción de RNA.	35
4.2.6	Retrotranscripción y qPCR para la cuantificación del RNA de VHC y el mRNA de proteínas celulares.....	35
4.2.7	Extracción de proteínas e inmunotransferencia.	36
4.2.8	Cuantificación de ROS.	37
4.2.9	Cuantificación de Glutación total y relación GSH/GSSG.	39
4.2.10	Determinación de SAM por UPLC.....	40
4.2.11	Ensayo de actividad del proteasoma de tipo quimotripsina.	42
4.2.12	Metilación total de proteínas e inhibición de las reacciones de metilación.....	43
4.2.13	Estabilidad del RNA y traducción celular.....	43
4.2.14	Análisis estadístico y software utilizados.....	44
V.	RESULTADOS	45
5.1	SAM disminuye la expresión del VHC a nivel transcripcional y traduccional	45
5.1.1	Viabilidad celular	45
5.1.2	El efecto de SAM sobre el RNA del VHC es dosis-tiempo dependiente....	46
5.1.3	SAM disminuye la replicación del VHC y la expresión de la proteína estructural NS5A.	47
5.2	SAM regula el sistema antioxidante de las células Huh7-VHC replicón y parental.....	51
5.2.1	SAM induce la síntesis de glutación en células VHC replicón y parental....	51
5.2.2	SAM no modula a la producción de ROS en células que expresan VHC. .	54
5.2.3	SAM modula la expresión de SOD 1, SOD 2 y tioredoxina 1 a nivel transcripcional y traduccional.	60
5.3	El sistema del proteasoma y sus componentes son regulados en presencia de SAM.	65
5.3.1	SAM disminuye la actividad catalítica de tipo quimotripsina del proteasoma.	65
5.3.2	SAM disminuye la ubiquitinación total en células Huh7-VHC replicón.....	67
5.3.3	El inhibidor del proteasoma MG132 disminuye la expresión de la proteína NS5A.	68
5.4	El efecto de SAM sobre el VHC puede estar mediado por metilación. ..	69
5.4.1	SAM modifica el perfil de metilación total de proteínas en células Huh7-VHC replicón.	69
5.4.2	La inhibición de la metilación revierte el efecto de SAM sobre el VHC.....	70
5.5	El efecto de SAM no esta mediado por regulación en la estabilidad del RNA del VHC.....	71

5.6 SAM promueve la expresión de la enzima MAT1A, responsable de su biosíntesis.....	73
5.6.1 La expresión de MAT1A se encuentra sobre-regulada en presencia de SAM en células Huh7-VHC replicón.	73
5.6.2 La administración exógena de SAM estimula su propia biosíntesis endógena en células Huh7-VHC replicón.	76
5.7 SAM estimula la vía de respuesta antiviral de IFN tipo 2 y no la de IFN tipo 1.....	77
VI. DISCUSIÓN	80
VII. CONCLUSIONES	88
VIII. PERSPECTIVAS	91
XI. REFERENCIAS	92
ANEXOS	102
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia relativa del VHC y distribución de genotipos.....	3
Figura 2. Historia natural de la infección por hepatitis C.....	4
Figura 3. Genoma del VHC.....	6
Figura 4. Ciclo viral de la hepatitis C.....	8
Figura 5. Metabolismo de la metionina.	18
Figura 6. Estrategia general experimental.	33
Figura 7. Ensayo de viabilidad celular.	46
Figura 8. Ensayo dosis-respuesta de expresión de RNA-VHC por qPCR.....	47
Figura 9. Expresión de RNA-VHC por qPCR.....	48
Figura 10. Curva de estándares para cuantificación de proteína por Bradford.	49
Figura 11. Western blot de la proteína no estructural NS5A y de β -actina..	50
Figura 12. Densitometría correspondiente a 3 ensayos de western blot independientes para la proteína NS5A.....	50
Figura 13. Cuantificación de GSH y GSSG en células Huh7 parental.....	52
Figura 14. Cuantificación de GSH y GSSG en células Huh7-VHC replicón.	53
Figura 15. Nivel de ROS en células Huh7 parental. T	55
Figura 16. Nivel de ROS en células Huh7-VHC replicón.	56
Figura 17. Imágenes correspondientes al ensayo de Mitosox en células Huh7 parental.....	57
Figura 18. Imágenes correspondientes al ensayo de Mitosox en células Huh7- VHC replicón.....	58
Figura 19. Análisis de imagen con el software FRIDA.....	59

Figura 20. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para SOD1.	61
Figura 21. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para SOD2.	61
Figura 22. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para CAT.	62
Figura 23. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para TRX1.	62
Figura 24. Expresión a nivel transcripcional de proteínas antioxidantes.	63
Figura 25. Western blot de las proteínas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT y TRX1.	64
Figura 26. Actividad de tipo quimotripsina del proteasoma.	66
Figura 27. Ubiquitinación total de proteínas en presencia y ausencia de SAM y MG132.	67
Figura 28. Ubiquitinación total de proteínas en presencia y ausencia de SAM.	68
Figura 29. Efecto de SAM y MG132 sobre la expresión de la proteína no estructural NS5A.	69
Figura 30. Perfil de metilación global de proteínas en células Huh7-VHC replicón.	70
Figura 31. Efecto de la inhibición de las reacciones de transmetilación en la expresión de NS5A.	71
Figura 32. Efecto de la inhibición de la transcripción y traducción en la expresión del RNA-VHC.	72
Figura 33. Efecto de la inhibición de la traducción de proteínas celulares en la expresión de NS5A.	73
Figura 34. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para Mat1a.	74
Figura 35. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para Mat2a.	74

Figura 36. Expresión del mRNA de Mat1a y Mat2a en presencia y ausencia de SAM.	75
Figura 37. Expresión de MAT1A y MAT2A a nivel traduccional en células Huh7-VHC replicón por western blot.	76
Figura 38. Cuantificación de SAM intracelular por UPLC.	77
Figura 39. Expresión a nivel traduccional de las proteínas STAT1 y PKR.	78
Figura 40. Expresión a nivel transcripcional de IFN γ	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Antivirales contra el VHC directos usados actualmente y sus combinaciones	15
Tabla 2. Oligos y sondas utilizadas para qPCR.	36

ABREVIATURAS

3-DZA = 3-deaza adenosina
Act D = Actinomicina D
Akt = Protein kinase B
AMC = Amino metil cumarina
ATP = Trifosfato de adenosina
BCA = Ácido bicinconínico
CAT = Catalasa
cDNA = Ácido desoxirribonucleico complementario
CHC = Cáncer hepatocelular
CHX = Cicloheximida
Ct = Threshold Cycle
CYP2E1 = Citocromo P450 2 E1a
CYP3A = Citocromo P450 3A
DAPI = Dihidrocloruro de 4',6-diamidina-2'-fenil indol
DCFH-DA = Diclorofluoresceína diacetato
DMA = Dimetil argininas
DMSO = Dimetil sulfóxido
ELISA = Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EM = Espectrómetro de masas
E.U.A. = Estados Unidos de América
FDA = Food and Drug Administration
FRIDA = FRamework for Image Dataset Analysis
GAPDH = Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GSH = Glutati3n reducido
GSSG = Glutati3n oxidado
GPx = Glutati3n peroxidasa
IFN α = Interfer3n alfa

IFN γ = Interferón gamma
INEGI = Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática
IRES = sitio interno de entrada al ribosoma
JFH-1 = Japanese fullminant hepatitis 1
HBSS = Solución salina balanceada de Hank
LDL = Lipoproteínas de baja densidad
MAPK = Mitogen-activated protein kinases
Mat1a o MAT1A = metionina adenosil transferasa 1
Mat2a o MAT2A = metionina adenosil transferasa 2
MG132 = Inhibidor de la actividad del proteasoma
mRNA = RNA mensajero
MTT = Bromuro de 3-(4,5-Dimetil tiazol-2-il)-2,5-Difenil tetrazolio
NPT-II = Neomicina fosfotransferasa II
OMS = Organización Mundial de la Salud
PBS = Buffer de fosfatos salino
PDTC = ditiocarbamato de pirrolidina
PEG-IFN = Polietilenglicol interferón alfa
PI3K = Fosfoinositol 3 cinasa
PKR = Proteín cinasa R
qPCR = Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
RBV = Ribavirina
RE = Retículo endoplásmico
RFU = Unidades relativas de fluorescencia
RNA = Ácido ribonucleico
ROS = Especies reactivas de oxígeno
RPS18 = gen Ribosomal 18S
RT-PCR = Reacción en cadena de la Polimerasa de Transcriptasa inversa
RVS = Respuesta viral sostenida
SAH = S-adenosil homocisteína

SAM = S-adenosil metionina

SBF = Suero fetal bovino

SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SOD1 = superóxido dismutasa 1

SOD2 = superóxido dismutasa 2

STAT1 = Signal transducer and activator of transcription 1

TBS = Tris buffer salino

TNF- α = Factor de necrosis tumoral alfa

TRX1 = Tiorredoxina 1

UPLC = Ultra Performance Liquid Chromatography

UTR = Región no codificante

VHB = Virus de la hepatitis B

VHC = Virus de la hepatitis C

VIH = Virus de Inmunodeficiencia Humana

VLDL = Lipoproteínas de muy baja densidad

°C = Grados centígrados

μ L = microlitros

μ g = microgramos

mL = mililitros

L = litro

g = gramos

mg = miligramos

ng = nanogramos

mM = milimolar

μ M = micromolar

Fw= Forward

Rv= Reverse

h = horas

min = minutos

RESUMEN

Presenta: M.C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda

Fecha de graduación: Noviembre 2016

Título del tesis: Evaluación de la participación de la S-adenosil metionina (SAM) y su mecanismo de acción en la regulación de la expresión génica del VHC.

Introducción. A nivel mundial la hepatitis C es la principal causa de hepatitis crónica, la cual puede evolucionar a cirrosis o CHC y es una de las indicaciones principales para trasplante hepático. El agente etiológico es el VHC, el cual puede causar daño celular mediante aumento en el estrés oxidativo y generación de especies reactivas de oxígeno. Se sabe que el VHC requiere del correcto funcionamiento del sistema de proteasoma celular, el cual es responsable de la degradación de proteínas vía dependiente e independiente de ubiquitina. Recientemente se reportó que SAM disminuye el nivel de RNA-VHC, sin embargo, el mecanismo involucrado es desconocido. SAM es capaz de modificar el sistema del proteasoma en cáncer hepático, es el principal donador de grupos metilo y el principal precursor de la síntesis de glutatión. **Material y métodos.** Células Huh7-VHC replicón fueron incubadas con SAM 1mM. Se realizó qPCR para RNA-VHC, mRNA de proteínas antioxidantes, mat1, mat2 e IFN γ . Se realizó western blot para detectar NS5A, proteínas antioxidantes, MAT1A y MA2A, proteínas metiladas y ubiquitinadas, PKR y STAT1. Se midió el nivel de GSH, GSSG y ROS. Se cuantificó la actividad de quimotripsina del proteasoma. Las células fueron expuestas a diferentes tratamientos como actinomicina D, cicloheximida, dza-3, MG132, H₂O₂ y PDTC. Por último, se midió la concentración de SAM intracelular mediante HPLC. **Resultados.** SAM inhibe la replicación del VHC a nivel transcripcional y el efecto es dosis y tiempo dependiente, a una dosis de 1mM. SAM disminuye un 50-60% la expresión del VHC a nivel transcripcional y traduccional durante 24-72 h de tratamiento. El efecto de SAM se potencia cuando se adiciona PEG-IFN y RBV, disminuyendo hasta un 90% de la replicación del virus. Dicho efecto no está mediado por modulación en ROS en citoplasma y mitocondria, ya que al exponer a las células al tratamiento con SAM, éstas no muestran disminución o cambios significativos en la producción de peróxidos intracelulares o en la generación de anión superóxido en mitocondria. SAM es capaz de modular negativamente la actividad de quimotripsina del proteasoma y disminuir la ubiquitinación de proteínas totales. El efecto se potenció al combinar un inhibidor del proteasoma (MG132) con SAM, obteniendo un efecto sinérgico. La metilación participa parcialmente en el efecto de SAM sobre la expresión del VHC, ya que al inhibir las reacciones de transmetilación, se recupera el nivel de expresión del virus. SAM no altera la estabilidad del RNA viral y necesita de factores celulares para ejercer su efecto, según los resultados obtenidos en los ensayos de act D y CHX. SAM induce un recambio en la expresión de MAT1A/MAT2A favoreciendo la síntesis de novo de SAM en la célula. El tratamiento con SAM incrementa el nivel IFN γ a nivel transcripcional, pero no modifica la expresión a nivel traduccional de PKR y STAT1. **Conclusiones.** Se identificó un nuevo mecanismo de acción de SAM que involucra la disminución de la actividad de quimotripsina y disminución de la ubiquitinación. el mecanismo por el cual SAM disminuye la replicación del VHC no involucra una acción como antioxidante. SAM induce el recambio de la expresión de MAT2A por MAT1A y es dependiente del proceso de metilación para llevar a cabo su efecto antiviral contra el VHC.

Dra. Ana María Rivas Estilla

I. INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una de las enfermedades infecciosas de gran importancia médica a nivel mundial: primero, por el significativo número de personas infectadas (~200 millones de individuos) en el mundo¹; segundo, es la principal causa de hepatitis crónica, la cual puede evolucionar a cirrosis o carcinoma hepatocelular (CHC) y es una de las indicaciones principales para trasplante hepático^{2,3}; y tercero, las opciones terapéuticas que están disponibles, son poco accesibles y costosas para la mayoría de la población⁴⁻⁷. En México, la hepatitis C figura dentro de las principales causas de cirrosis hepática. Esta última representa la segunda causa de muerte en personas entre los 35 y 55 años de edad y ocupa el quinto lugar dentro de las principales causas de mortalidad en México, precedida por enfermedades cardíacas, diabetes mellitus, tumores malignos y accidentes, de acuerdo con las estadísticas reportadas por el Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI)⁸. La hepatitis crónica por virus C, representa la hepatopatía más frecuente reportada en México, en conjunto con la hepatopatía por alcohol.

En la mayoría de los casos, la respuesta inmune es incapaz de eliminar al virus y esto se traduce en su persistencia. Los pacientes con infección persistente están en alto riesgo de desarrollar enfermedades crónicas hepáticas como cirrosis y carcinoma hepatocelular⁹. Entre los factores de riesgo para la enfermedad progresiva, se han establecido como importantes: la edad en el momento de adquirir la enfermedad, el sexo masculino, la duración estimada de la enfermedad, consumo excesivo de alcohol y coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B (VHB)^{10,11}.

1.1 Epidemiología de la hepatitis C

Después de adquirir la infección por el VHC, solamente el 15% de los individuos pueden eliminar la infección y curarse, y el restante 85% permanece con infección crónica, con riesgo de desarrollar cirrosis y carcinoma hepatocelular. La infección por VHC es responsable de la inflamación del hígado y aproximadamente un 20% de los pacientes que son portadores progresa a cirrosis hepática con un alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular. De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca de 200 millones de individuos en todo el mundo están afectados con el VHC. La infección crónica por el VHC es la primera causa de cirrosis y carcinoma hepatocelular y se ha convertido en la primera indicación de trasplante hepático como manifestación de enfermedad hepática terminal¹²⁻

Una de las características más destacables del VHC es su extrema heterogeneidad genética, la cual se identifica a dos niveles: los genotipos (siete genotipos) y las cuasiespecies. Los diferentes genotipos pueden aparecer en cualquier parte del mundo pero existen diferencias notables en cuanto a su distribución geográfica. Así, los genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c y 3a constituyen el 90% de todas las infecciones en toda América, Europa, China, Japón, Australia y Nueva Zelanda. Los genotipos 1b y 1a son los causantes del 40% de todas las infecciones en E.U.A. y son especialmente prevalentes en el sur y este de Europa, así como en China y Japón¹⁵. En la figura 1 se observa que en la región de Latinoamérica central, en donde se incluye a México, existe una mayor prevalencia del genotipo 1 (representado con color rojo en el gráfico de pastel), seguido del genotipo 2 y 3. En México, el 75% de los pacientes presenta infección por genotipo 1¹⁶.

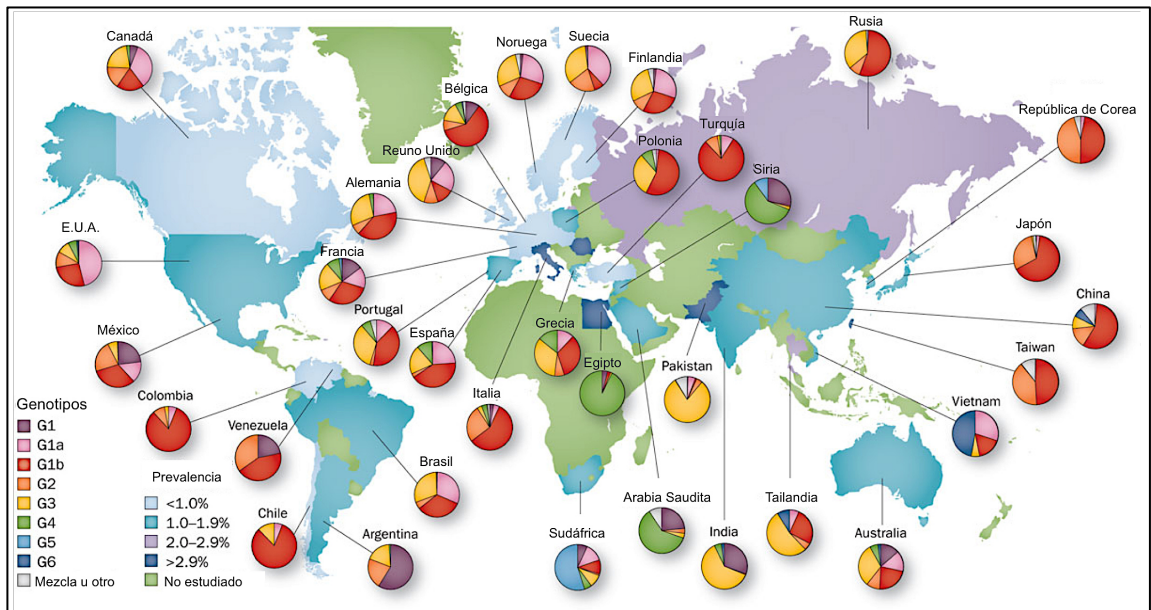


Figura 1. Prevalencia relativa del VHC y distribución de genotipos. (Imagen modificada de Hajarizadeh, et al.¹⁷)

1.2 Historia natural de la infección crónica por el VHC, factores de riesgo y transmisión

La infección crónica por el VHC es una enfermedad de baja morbimortalidad durante las primeras décadas de evolución de la infección. De todos los pacientes infectados por el VHC que evolucionan a la cronicidad, sólo un 20% desarrollará cirrosis hepática (en unos 15-20 años, figura 2) ^{18,19}. En el resto, la infección causa una hepatitis crónica que raramente causa problemas clínicos. No todos los individuos evolucionan de la misma manera ni con la misma rapidez hacia fases más avanzadas de la hepatopatía. Poynard y colaboradores, describieron diferentes patrones en función de la velocidad de progresión hacia la cirrosis (edad, momento de contagio con VHC, sexo, consumo de alcohol y co-infección con otros virus) ^{20,21}.

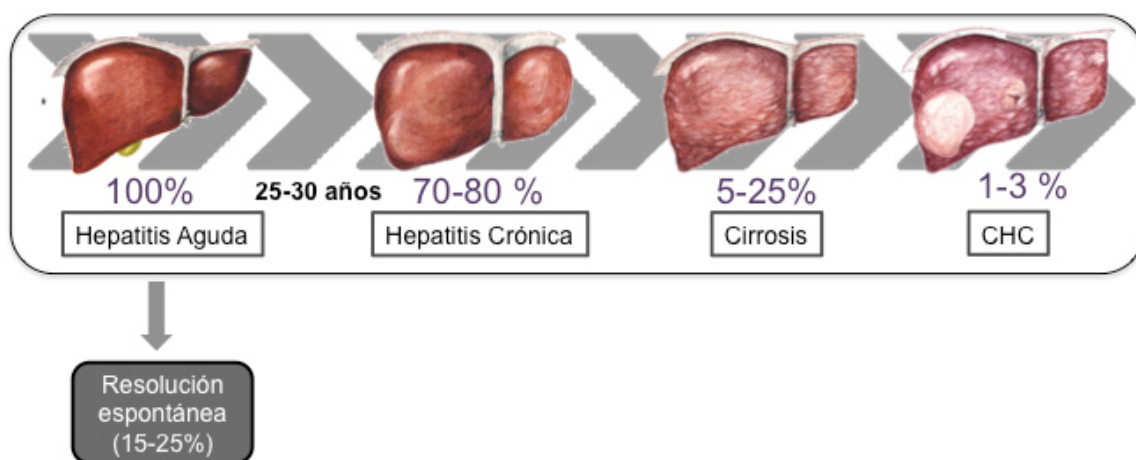


Figura 2. Historia natural de la infección por hepatitis C.

El VHC se adquiere primariamente por contacto con la sangre y productos sanguíneos. Las transfusiones sanguíneas y el uso de agujas y jeringas compartidas, no esterilizadas o inadecuadamente esterilizadas, han sido las causas principales de la transmisión del VHC. Con la introducción en 1991 de la búsqueda rutinaria del anticuerpo para VHC y la mejoría en la pruebas de detección, la hepatitis C relacionada a transfusión ha desaparecido virtualmente. En el presente, el uso de drogas inyectables es el factor de riesgo más común para contraer la enfermedad. Aún así, muchos pacientes adquieren la hepatitis C sin ninguna exposición conocida a sangre y sus derivados o al uso de drogas^{22,23}.

1.3 Biología Molecular del VHC

El VHC fue identificado en 1989 por inmunodetección de suero de un paciente con hepatitis no A, no B²⁴. Está clasificado dentro del género *Hepacivirus* en la familia *Flaviviridae*, existen 7 genotipos del virus y más de 67 subtipos. Estos genotipos difieren alrededor de 31 a 34 % en sus secuencias nucleotídicas, en tanto que los subtipos difieren cerca del 20 al 23%². El genoma del VHC consiste de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva con una longitud de aproximadamente 9,600 nucleótidos, posee una región no codificante (UTR, *untranslated region*) en 5', luego le sigue la región IRES (la traducción del genoma esta bajo el control de IRES (*internal ribosome entry site*))^{25,26}, un marco de lectura abierta que codifica para una poliproteína de alrededor de 3 mil aminoácidos, y que está sometida a procesamiento co- y

post-traduccion por proteasas de la célula huésped y virales para producir proteínas virales individuales y una 3'UTR²⁷. La poliproteína viral es procesada por una combinación de proteasas celulares y virales, las proteínas estructurales, las cuales forman la partícula viral, incluyen la proteína del core y las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2. Las proteínas no estructurales incluyen el canal iónico P7, la proteasa NS2-3, la serin proteasa NS3 y la RNA helicasa, el polipéptido NS4A, las proteínas NS4B y NS5A; y la NS5B, que corresponde a la polimerasa dependiente de RNA²⁸.

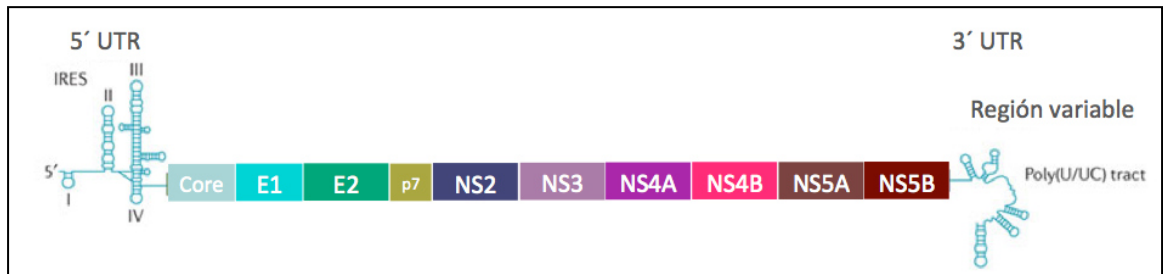


Figura 3. Genoma del VHC.

La región UTR 5', es altamente conservada y tiene una longitud de unos 340 nucleótidos y precede el codón de iniciación de la traducción. La UTR 3' de longitud variable consiste en una cadena corta no conservada de alrededor de 28-42 nucleótidos²⁹. El VHC solo infecta a humanos y chimpancés, es un virus hepatotrópico, es decir, infecta a hepatocitos; hay poca evidencia de que el virus es capaz de infectar otros tipos celulares, ya que el VHC depende de la presencia de ciertos receptores de membrana: claudina 1, ocludina, receptor del factor de crecimiento epidermal, receptor de efrina 2 tipo-A, receptores de lipoproteínas de baja densidad, receptor scavenger (SR)-B1 y CD81³⁰⁻³²; y si

bien algunas células diferentes a los hepatocitos poseen algunos de estos receptores, no es suficiente para internalizar el virus y replicarlo eficientemente³³. El virus circula en el huésped, unido a lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL), además también circula unido a inmunoglobulinas o como virión libre³⁴. El virus se internaliza vía endocitosis mediada por clatrina, después de la unión, la nucleocápside del virus envuelto se libera en el citoplasma de la célula, como resultado de un proceso de fusión entre las membranas virales y celulares. La fusión es mediada por proteínas virales especializadas y se lleva a cabo directamente en la membrana plasmática o en la subsecuente internalización de la partícula en los endosomas³⁵. El proceso de ingreso es modulado por las glicoproteínas de superficie viral que desencadenan los cambios requeridos para mediar la fusión²⁹. La pérdida de la envoltura libera el RNA al citoplasma que junto con las nuevas cadenas sintetizadas de RNA, actúan como RNA mensajeros para la síntesis de la poliproteína. La poliproteína es procesada para su maduración. El virus se replica mediante la formación de un complejo asociado a la membrana, compuesto por proteínas virales, RNA en replicación y membranas celulares alteradas, es una característica de todos los virus de RNA de cadena positiva investigado hasta la fecha. Este complejo, específicamente conocido como red membranosa, fue identificado como el sitio de replicación del RNA viral en un modelo de replicón subgenómico³⁶. Posteriormente se ensamblan las partículas virales y son liberadas por medio de exocitosis²⁹.

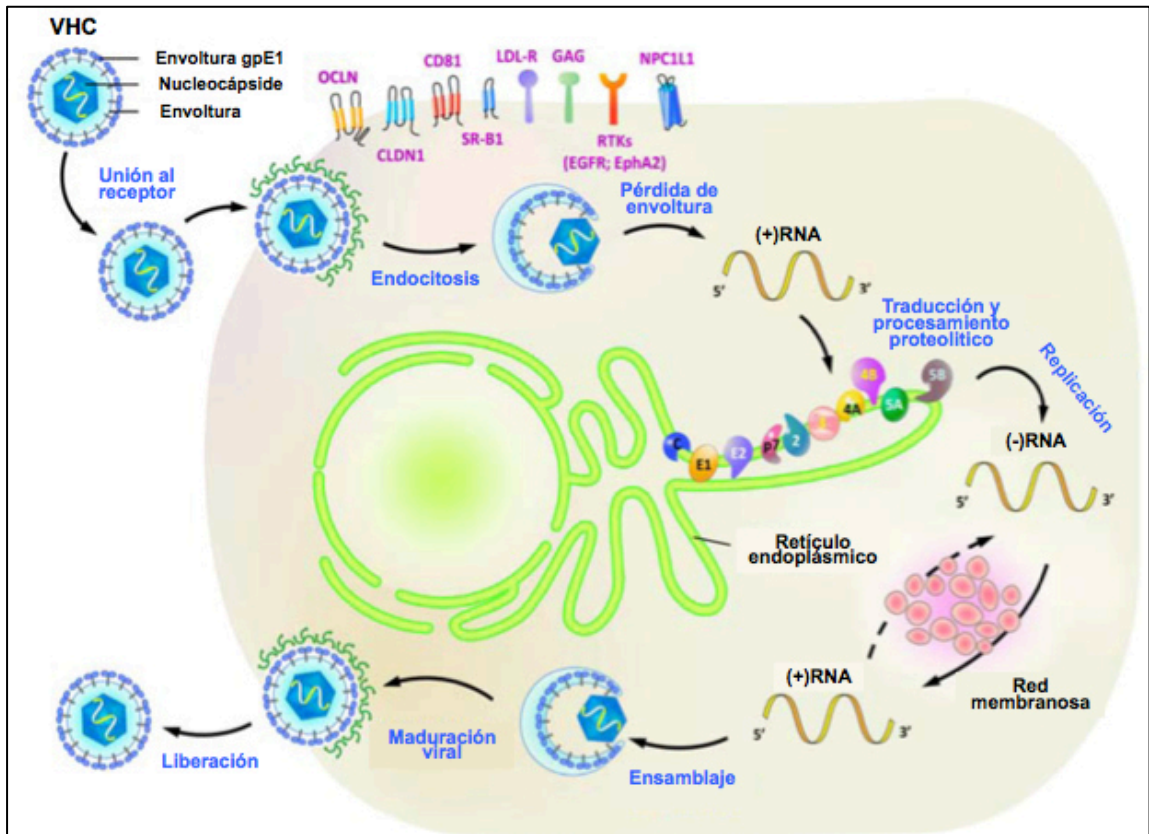


Figura 4. Ciclo viral de la hepatitis C. Imagen modificada de Ke y Chen³⁷.

1.4 Modelos experimentales para el estudio de la replicación del VHC

Dada la importancia clínica de la hepatitis C crónica y a la necesidad de identificar nuevos blancos terapéuticos, es importante conocer los mecanismos moleculares que participan en la persistencia del VHC en las células infectadas, así como los factores que promueven la progresión del daño hepático. El desarrollo de nuevos agentes antivirales ha estado limitado por la pobre disponibilidad de modelos experimentales en los que se puedan estudiar los

efectos de los fármacos³⁸. Esto ha dificultado enormemente el desarrollo de nuevas alternativas para la profilaxis y el tratamiento de la hepatitis C crónica.

La tecnología disponible hasta el momento ha permitido empezar a entender los mecanismos de replicación del VHC, así como su organización genómica, persistencia, síntesis y funcionamiento de las proteínas virales^{38,39}. Sin embargo, aún queda mucho camino por recorrer en el conocimiento de la patogénesis de la infección crónica y evolución a carcinoma hepatocelular. A continuación se mencionan los modelos que se han propuesto y utilizado para estudiar el VHC.

1.4.1 Modelos animales (*in vivo*) para el estudio del VHC.

- Chimpancé (*Pan troglodytes*): este ha sido un modelo valioso para estudiar las interacciones VHC-huésped y vacunas, pero su uso se ve fuertemente obstaculizado por las limitaciones financieras y éticas.
- Musaraña arborícola (*Tupaia belangeri*): son mamíferos no roedores tipo ardilla que se han reportado ser permisivos para la infección por VHC⁴⁰. A pesar de que algunos de los animales desarrollan desórdenes hepáticos, la viremia no se mantiene y solo se detecta intermitentemente.
- Modelos animales murinos transgénicos o humanizados. Para lograr que un virus hepatotrópico humano pueda reconocer otros animales o células es necesario que el huésped o al virus sean adaptados. El tropismo de VHC podría modificarse permitiendo que el virus se adaptara a un entorno no humano; Bitzegeio y colaboradores, reportaron recientemente que un virus adaptado a ratones fue capaz de infectar, replicar y producir

nuevas partículas virales infecciosas en células de ratón con inmunidad innata defectuosa⁴¹. Por otro lado, un ratón genéticamente humanizado que expresa el conjunto mínimo de receptores o factores humanos mediante una transducción transitoria adenoviral puede ser compatible con la entrada del VHC, lo cual permite la evaluación de inhibidores de la entrada y candidatos de vacunas contra el VHC⁴².

1.4.2 Sistemas *in vitro* para el estudio del VHC.

- Transfección de líneas celulares con clones del genoma del VHC. Estudios recientes han conducido al desarrollo de sistemas de cultivo de VHC infeccioso. Wakita y colaboradores, desarrollaron un replicón completo del genotipo 2A (JFH-1) el cual fue aislado de un paciente japonés con hepatitis fulminante. Este genoma completo de VHC se replica eficientemente y produce partículas virales en células Huh7.5.1⁴³⁻⁴⁵. El modelo posee algunas limitantes como que esta clona fue aislada de una hepatitis fulminante, un evento raro en hepatitis; otra importante limitante es que las partículas son del genotipo 2, el cual no es el más prevalente a nivel mundial.
- Transfección de líneas celulares con replicones subgenómicos del VHC. Lohmann y colaboradores, en 1999³⁹ desarrollaron el sistema de replicones subgenómicos del VHC, que contiene las regiones 5' y 3' UTR (incluyendo la región IRES del VHC), así como, la región que codifica para las proteínas no estructurales del VHC (NS3-NS5B), además, de una secuencia nucleotídica que codifica para la enzima neomicina

fosfotransferasa II (NPT-II) y el IRES del virus de encefalomiocarditis. De manera que, los replicones subgenómicos del VHC aún careciendo de la región que codifica para las proteínas estructurales del VHC, contiene todos los elementos necesarios para estudiar su replicación y traducción. Es decir, un replicón es la mínima estructura genética del virus capaz de replicarse por sí misma en las células del huésped. De este modo, son capaces de producir nuevas moléculas subgenómicas que a su vez, pueden continuar replicándose, pero no son capaces de originar virus completos infecciosos, por lo tanto, es un sistema seguro para trabajar. Estos replicones se reproducen con alta eficiencia en la línea celular de hepatoma humano Huh7³⁹.

1.5 VHC y estrés oxidativo

Es bien sabido que la replicación del VHC está asociada con el retículo endoplásmico (RE), donde el virus induce estrés celular. Este hecho se ha asociado con una regulación específica del ciclo de replicación del virus⁴⁶. El estrés oxidativo se produce cuando la generación de especies oxidantes en el medio extracelular o dentro de la célula supera las defensas antioxidantes celulares^{47,48}. Una perturbación importante en el balance pro-oxidante-antioxidante a favor de la pro-oxidante puede conducir a daño celular. Varios reportes demuestran que la expresión del VHC eleva los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de diferentes vías incluyendo principalmente la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos

(MAPK), activación de la respuesta en RE y el factor de necrosis kappa B (NF-kB) y señalización de calcio. Este calcio es fácilmente tomado por la mitocondria, lo que resulta en la elevación de ROS. En las células sanas, ROS generalmente existe en equilibrio con antioxidantes, sin embargo, cuando se interrumpe este equilibrio, se genera una acumulación de ROS en las células que causan estrés oxidativo⁴⁹. Las células están protegidas contra el daño por estrés oxidativo por diferentes compuestos antioxidantes intracelulares, principalmente glutatión (GSH) y tioredoxina 1 (TRX1), y por una serie de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), y hemo-oxigenasa-1⁵⁰⁻⁵².

Actualmente, hay gran cantidad de datos que demuestran que diferentes vías de señalización intracelular son manipuladas por las proteínas del VHC para su propia replicación y están finamente reguladas por el estado óxido-reductor de la célula huésped. Las vías de señalización MAPK y PI3K / Akt son reguladores críticos de la replicación del VHC y a su vez estas vías son moduladas por las cascadas defosforilación y el estrés oxidativo⁵³⁻⁵⁶.

1.6 Terapia actual

Se han logrado grandes avances en cuanto a la terapia contra el VHC desde el 2011, año en el cual fueron aprobados por la FDA (Food & Drug Administration, E.U.A.) la primera generación de antivirales de acción directa

(DAAs, del inglés, *direct antiviral agents*) contra el VHC, boceprevir y telaprevir. Sin embargo, estos ya no se encuentran en las recomendaciones de las guías internacionales de terapia contra el VHC^{4,5,57}. En los años posteriores se aprobaron los fármacos de segunda generación, incluyendo simeprevir, con lo que se logró una RVS (carga viral negativa 24 semanas después de haber terminado el tratamiento) de 81%. Con los DAAs aprobados a partir del 2013, sofosbuvir⁶, ledipasvir, daclatasvir⁵⁸, asunaprevir, paritaprevir, ombitasvir, dasabuvir, elbasvir y grazoprevir, la RVS es superior al 95%^{7,59}.

Existen en México algunas combinaciones aprobadas, una de ellas es una combinación de antivirales que se comercializa bajo el nombre de Viekira XR, esquema que incluye los antivirales dasabuvir (200 mg, inhibidor de NS5B), ombitasvir (8.33 mg, inhibidor NS5A), paritaprevir (50 mg, inhibidor de la proteasa NS3/4A), y ritonavir (33.33 mg). Adicionalmente, este esquema terapéutico es supervisado para mejorar adherencia⁶⁰. Estos nuevos esquemas confieren una RVS mayor al 95% en la mayoría de los genotipos, incluido el genotipo 1, que es el más prevalente en México y más difícil de tratar hasta la aparición de los DAAs.

El tratamiento estándar para los pacientes con hepatitis C consistía hasta hace unos años de interferon pegilado alfa (PEG-IFN) en combinación con ribavirina (RBV) por 24 a 48 semanas. Con dicho tratamiento se alcanzaba una RVS de un 45 a 50% de los casos (42% para los pacientes con genotipo 1 y en más del 80% para pacientes con genotipos 2 y 3)^{61,62}. Al utilizar esta terapia, algunos pacientes muestran una respuesta viral transitoria, con recaída y

reaparición del RNA de VHC durante la terapia (breakthrough). O bien, aquellos que habían logrado una RVS, después de suspender el tratamiento antiviral, presentan una recaída. Ninguno de los dos ejemplos anteriores logran una RVS. Otros pacientes tienen niveles detectables del RNA de VHC a todo lo largo del período de tratamiento completo, siendo respondedores nulos. Dentro de los factores que favorecen una RVS, en los pacientes tratados con PEG-IFN y RBV, se encuentran factores virales (genotipo 2 y 3, baja carga viral, hepatitis aguda, etc.), factores relacionados al huésped (sexo, edad, etc.), y factores metabólicos (resistencia a la insulina) ⁶³. Cada vez son menos pacientes los tratados con PEG-IFN y RBV; ya que actualmente, las guías internacionales de tratamiento para VHC están enfocadas en esquemas libres de PEG-IFN, sin embargo, algunas combinaciones de DAAs aun incluyen RBV. Durante esta nueva era de antivirales específicos, se ha observado que los pacientes infectados con genotipo 3, cuando se comparan con los demás genotipos, poseen rangos de progresión a cirrosis relativamente más rápidos, alta prevalencia de esteatosis severa, y una mayor incidencia de CHC⁶⁴. Actualmente, los pacientes con genotipo 3 son más difíciles de tratar comparados con los otros genotipos, especialmente en pacientes con cirrosis⁶⁴.

Tabla 1. Antivirales contra el VHC directos usados actualmente y sus combinaciones ⁷.

Antiviral	Mecanismo de acción	Posología
Sofosbuvir (<i>Sovaldi</i>)	Análogo de nucleótido, inhibidor de la polimerasa NS5B.	Tableta de 400 mg una vez al día, o dependiendo de las recomendaciones para cada genotipo. Tratamiento de 12 semanas.
Ledipasvir y sofosbuvir (<i>Harvoni</i>)	Ledipasvir (inhibidor de NS5A).	Dosis combinada de ledipasvir-sofosbuvir (90mg/400mg)/ día.
Viekira XR: dasabuvir, ombitasvir, paritaprevir, y ritonavir.	Dasabuvir (inhibidor no nucleósido de NS5B), ombitasvir (inhibidor de NS5A), paritaprevir (inhibidor de la proteasa NS3/4A), ritonavir (inhibidor de CYP3A y del proteasoma).	Viekira XR (200/8.33/50/33.33 mg) con o sin RBV dependiendo del genotipo y la presencia de cirrosis. Tratamiento 12 o 24 semanas. Dosis recomendada: 3 tabletas una vez al día.
Daclatasvir	Inhibidor de NS5A.	Tabletas de 30 o 60 mg una vez al día.
Simeprevir	Inhibidor de la proteasa NS3/4A.	Tabletas 150 mg una vez al día.
Elbasvir y grazoprevir (<i>Zepatier</i>)	Elbasvir (inhibidor de NS5A) y grazoprevir (inhibidor de NS3/4A)	Tabletas 50/100 mg, con o sin RBV por 12 semanas.

Uno de los retos, una vez que se elimine al virus con el uso de los nuevos antivirales, es tratar la enfermedad hepática remanente, ya que los antivirales solo están dirigidos para bloquear la replicación viral. Los pacientes con fibrosis o cirrosis, requerirán tratamiento para revertir el daño hepático causado por la infección previa. Uno de los compuestos que se está estudiando en México y otros países, es la pirfenidona⁶⁵. Este compuesto originalmente se comenzó a usar para tratar pacientes con fibrosis pulmonar idiopática leve o moderada, a partir del 2014 fue aprobado por la FDA para tratar esa patología⁶⁶. En México está siendo probada para tratar la fibrosis en pacientes con infección por VHC mostrando resultados promisorios; se ha dado tratamiento por 2 años y mejora la inflamación, fibrosis y esteatosis en un mayor número de pacientes que en tratamientos previos de 12 meses⁶⁵. Una terapia ideal contra la hepatitis C crónica, involucra el tratamiento con antivirales de acción directa y un agente antifibrótico, lo cual será uno de los retos en los próximos años⁶⁷.

1.7 S-adenosil metionina

S-adenosil Metionina (SAM), participa en diferentes vías de regulación y síntesis en la célula. SAM es una molécula que se encuentra normalmente en todos los tejidos del organismo; es fundamental para las reacciones de donación de grupos metilo, y sirve como precursor de la síntesis de monoaminas, la generación de fosfolípidos de membrana y la síntesis de folatos⁶⁸. Es muy importante en la vía de transulfuración y reducción; por ejemplo, la síntesis de homocisteína, cisteína y glutatión reducido, que son los principales antioxidantes y detoxificadores celulares. SAM se produce

normalmente en el organismo a partir de metionina y ATP (trifosfato de adenosina) mediante la participación de la enzima metionina adenosil transferasa (MAT). Las metionina adenosil transferasas específicas y no específicas de hígado, son producto de dos genes *mat1a* y *mat2a*, respectivamente, que catalizan la formación de SAM en mamíferos⁶⁹. *Mat1a* se expresa solo en hígado, y codifica para la subunidad α 1 encontrada en dos isoenzimas de MAT, las cuales son un dímero (MAT3) o un tetrámero (MAT1A) de esta subunidad⁷⁰. *Mat2a* codifica para la subunidad catalítica α 2 encontrada en la isoenzima MAT2A, la cual se expresa en tejido extrahepático, hígado fetal y es reemplazada por *mat1a* durante el desarrollo⁷⁰⁻⁷³. Las isoformas de MAT difieren en sus propiedades reguladora y de cinética. MAT1A y MAT2A tienen bajas valores de Km para metionina, mientras que MAT3 tiene una alta Km para metionina. MAT1A y MAT3 son inactivadas de manera reversible por el óxido nítrico y los radicales hidroxilo, mientras que MAT2A es inhibida por concentraciones fisiológicas de SAM. Se piensa que MAT3 es responsable del aclaramiento de metionina después de una comida rica en proteína, mientras que MAT1A como MAT2A fuera del hígado, mantienen el contenido basal de SAM requerido por el hígado bajo condiciones de ayuno⁷⁴. La actividad de MAT1A disminuye en pacientes con insuficiencia hepática, lo que lleva a una deficiencia en los niveles de SAM hepática y de las sustancias en cuya síntesis participa. Estas deficiencias pueden revertirse con la administración exógena de SAM. Los pacientes con insuficiencia hepática tienen afectadas las vías metabólicas de detoxificación⁷⁵⁻⁷⁷.

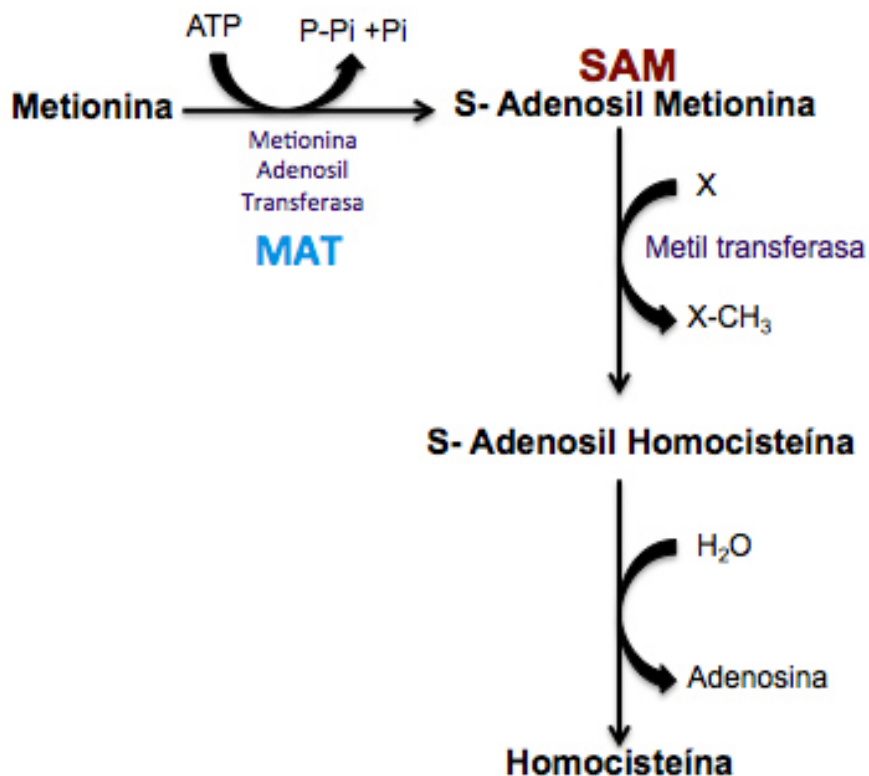


Figura 5. Metabolismo de la metionina. Participación de las MAT en la síntesis de SAM.

El metabolismo de la metionina está alterado en pacientes con cirrosis hepática. El tratamiento con SAM en daño hepático experimental tiene efecto hepatoprotector⁷⁵. Las enzimas que metabolizan SAM se encuentran disminuidas en pacientes con cirrosis hepática, el mRNA de los principales genes involucrados en el metabolismo de la metionina están marcadamente disminuidos en pacientes con cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular, la hipermetilación de la metionina adenosil transferasa puede participar en esta expresión reducida en pacientes cirróticos⁷⁶. En modelos experimentales se ha visto un efecto reparador de daño hepático con SAM y además previene la

aparición de carcinoma hepatocelular. Se han propuesto varios mecanismos de acción en la hepatoprotección por SAM, como aumento en los niveles de glutatión, cambios en la metilación del DNA, mejoría en la fluidez de membrana, disminución del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e inhibición de la síntesis de colágena I ⁷⁵. Los pacientes alcohólicos, con insuficiencia hepática, tienen escasas reservas de glutatión reducido y baja actividad de glutatión reductasa. Estudios *in vitro* han demostrado que SAM aumenta los niveles de glutatión reducido en hepatocitos aislados y que tiene un efecto protector contra el daño inducido por alcohol.

1.7.1 SAM como donador de grupos metilo

Diversos estudios han demostrado que la aplicación *in vitro* de SAM inhibe la angiogénesis e induce efectos anti-proliferativos y anti-metastásicos así como apoptosis en células cancerígenas de colon e hígado a ciertas dosis⁷⁸⁻⁸⁰. Se ha hipotetizado que tal efecto es debido a cambios en la metilación sin embargo los resultados no son concluyentes⁸¹. Ha sido asociada a la re-metilación de promotores y la regulación a la baja de la expresión de los proto-oncogenes en células cancerígenas. Además Feld y colaboradores reportaron en el 2011 que SAM promueve la metilación del factor de transcripción STAT1 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription*), mostrando así que SAM es capaz de inducir la metilación de proteínas⁸².

1.7.2 SAM y la síntesis de GSH

SAM es el principal precursor de la síntesis de GSH, el cual es el principal tiol no proteico encontrado en células que juega múltiples papeles en la fisiología celular, detoxificación de compuestos químicos tóxicos y electrófilos, y regulación de la muerte celular. GSH es sintetizado en citosol pero se puede encontrar una fracción de éste (10-15%) en mitocondria, donde protege contra el peróxido de hidrógeno y otras ROS. La disminución de los niveles de GSH ha sido relacionado con enfermedades hepáticas. SAM ha demostrado recuperar los niveles de GSH a niveles basales y además ejerciendo un efecto protector contra el daño hepático causado por el consumo de alcohol, en estudios hechos en ratas⁸³. Por otro lado, en pacientes se ha demostrado que la administración de SAM resulta en un incremento significativo de los niveles de GSH hepático en pacientes con enfermedad hepática alcohólica y no alcohólica⁸⁴. Se ha reportado que SAM potencia las actividades de SOD y glutatión s-transferasa, y restaura el nivel de glutatión en cerebro y la peroxidación de lípidos en eritrocitos⁸⁵. Estos resultados destacan la importancia que SAM pueda tener en la regulación del estrés oxidativo celular.

1.7.3 SAM como modulador del proteasoma

Además del efecto tipo antioxidante, existen reportes demostrando un efecto negativo de SAM sobre el sistema de degradación por proteasoma⁸⁶. El proteasoma es el complejo enzimático principal de degradación de proteínas en la célula, que degrada un 80% de proteínas intracelulares⁸⁷. Es crucial para la supervivencia celular, ya que juega un papel importante en destruir no solo las

proteínas normales si no también las dañadas. El proteasoma es un complejo cilíndrico que contiene una parte central de cuatro anillos formando un poro. Cada anillo está compuesto de siete proteínas individuales. Los dos anillos internos se componen de siete subunidades β que contienen tres o siete sitios de actividad proteasa. Los dos anillos externos cada uno contiene siete subunidades α las cuales su función es mantener una entrada por la cual las proteínas blanco entren al cilindro. Estas subunidades α son controladas mediante la unión de estructuras "cap" o subunidades reguladoras que reconocen el marcaje con poliubiquitina unido a las proteínas blanco para iniciar la degradación⁸⁸. En mamíferos, las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ son catalíticas, si bien comparten el mismo mecanismo de acción, tienen sustratos blanco diferentes, las 3 actividades catalíticas son: tipo quimotripsina, tipo tripsina y tipo caspasa (peptidil-glutamil péptido hidrolizante, PHGH)⁸⁹. Controla eventos de transducción de señales y respuesta inflamatoria, mediante la degradación de factores de transducción de señal. La función del proteasoma es regulada por los niveles de oxidantes intracelulares. En células hepáticas, el proteasoma está expuesto continuamente a oxidantes, debido a la cadena de transporte de electrones, como también a altos niveles de expresión del citocromo P450 2E1a (CYP2E1)⁹⁰. Múltiples agentes, incluyendo proteínas virales aumentan la generación de oxidantes en el hígado⁹⁰. La actividad del proteasoma es regulada por el cociente SAM:SAH en el hígado. En un cociente normal de SAM:SAH (3-5), los residuos de lisina en la subunidad del proteasoma 20S, están metilados y mantienen la función del proteasoma.

1.7.4 SAM y la señalización de IFN

Los IFN son un grupo de proteínas de señalización que son liberadas por la célula huésped en respuesta a la presencia de patógenos, como virus, bacterias, parásitos e incluso células tumorales. En el contexto de infección viral estas citocinas promueven la respuesta antiviral en la célula. Hay distintas clases de IFN, se clasifican según el receptor al que se unen y transmiten su señal. IFN tipo I: son todos los IFN que se unen al receptor IFN- α/β , estos incluyen al IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ y IFN- ω ; son producidos en fibroblastos y monocitos⁹¹. IFN tipo II: IFN γ en humanos, es activado por la interleucina 12, tiene un receptor distinto al de IFN tipo I⁹². Una vez que el IFN es reconocido por su receptor en la membrana, son activados diferentes miembros de la familia JAK (del inglés, *janus kinase*) y STAT, tirosin cinasas que transducen las señales río abajo de los receptores de membrana. Las cinasas JAK transfieren la señal a las STAT, en el caso de IFN- α/β , participan los STAT1 y STAT2 junto con otras proteínas, se translocan al núcleo y forman el complejo ISGF-3, el cual se une a un elemento en el DNA llamado ISRE (del inglés, *Interferon-stimulated response element*) encontrado en genes inducidos por IFN- α/β . En el caso de IFN γ , participa solo STAT1, el cual se une a otra región distinta del genoma, y estimula la expresión de genes inducidos por IFN γ ^{93,94}. Se ha reportado también que el IFN puede inducir la expresión de los STATs. La cinasa dependiente de RNA (PKR), es una de las proteínas que esta involucrada también en la señalización antiviral. Los dos tipos de IFN mencionados, pueden regular la expresión de los genes estimulados por IFN (ISGs) de manera STAT1 y PKR-independiente, mediante un mecanismo de señalización alternativo que

requiere el receptor de IFN γ y la cinasa JAK 1^{95,96}. De manera interesante, algunos genes son activados por IFN y solo cuando STAT1 esta ausente⁹⁵.

Existen reportes donde se sugiere que SAM actúa como potenciador de la señalización de IFN. Algunos de ellos reportan que el efecto antiviral del interferón en cultivo de tejidos puede mejorarse significativamente con la adición de SAM y betaina⁹⁷, y que SAM puede mejorar la metilación de STAT 1 y de esta manera mejorar la señalización de interferón⁸². SAM se utiliza como antioxidante y para tratar hepatopatías colestásicas, solo de forma reciente se ha empezado a estudiar su efecto en la replicación del VHC tanto *in vitro* como *in vivo*, con resultados interesantes sobre todo en pacientes no respondedores a tratamiento antiviral previo⁸².

En el 2011, se reportó la adición de SAM en el re-tratamiento de pacientes con hepatitis C no respondedores, combinado con PEG-IFN+RBV⁸², se encontró que 53% de los pacientes tuvieron respuesta viral temprana y 39% presentaron RVS. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual SAM tiene este efecto en la replicación del VHC.

Por todo lo anterior, consideramos que es relevante investigar los posibles mecanismos por los cuales SAM ejerce su efecto antiviral y de esta manera generar mayor conocimiento acerca de los mecanismos de patogenicidad del VHC, lo cual es de utilidad para la identificación de blancos terapéuticos que pudieran potenciar el efecto de la terapia antiviral actual.

II. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de fármacos para combatir la hepatitis C, ha tenido una aceleración vertiginosa. De tal manera que hasta el 2011 el tratamiento contra la hepatitis C consistía en la administración de PEG-IFN y RBV, sin embargo, tal esquema presentaba una respuesta baja en los pacientes, particularmente en los infectados con genotipo 1, y numerosos efectos adversos. Actualmente las nuevas terapias antivirales se enfocan en esquemas libres de interferón y en la administración de DAAs con potente actividad contra el VHC con índices de eliminación del virus cercanas al 100%. Adicionalmente, se han investigado otras moléculas endógenas que prometen facilitar la eliminación del virus utilizando mecanismos activados dentro de las mismas células. SAM es una molécula endógena que participa en diversos procesos metabólicos y que ha mostrado actividad antioxidante y de regeneración celular. Feld y colaboradores demostraron que la adición SAM al esquema de PEG-IFN

y RBV, mejora la respuesta en pacientes no respondedores; sin embargo, el mecanismo de acción no se conoce. Para profundizar más sobre los mecanismos moleculares implícitos en esta observación, en este trabajo nos propusimos investigar el efecto de SAM contra la replicación del VHC *in vitro* y conocer los mecanismos moleculares por los cuales este efecto se lleva a cabo. Esto nos permite aportar más conocimiento acerca de los mecanismos de patogenicidad del VHC, útil para la identificación de blancos terapéuticos que pudieran potenciar el efecto de la terapia antiviral actual.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la participación de SAM en la regulación de la expresión del VHC y estudiar los posibles mecanismos de acción involucrados.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del tratamiento con SAM como monoterapia y combinado con PEG-IFN+RBV en la expresión del VHC utilizando un sistema *in vitro* de replicones subgenómicos.
2. Evaluar la influencia del tratamiento con SAM en la regulación de los sistemas oxidantes/antioxidantes en células Huh7-VHC replicón y parental, y su relación con la expresión génica viral.

3. Estudiar el efecto del tratamiento con SAM en la regulación de la función del proteasoma en células que expresan las proteínas del VHC.
4. Determinar si existe un perfil diferencial de metilación de proteínas en células tratadas con SAM.
5. Proponer los posibles mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica inducidos por SAM en células que expresan las proteínas del VHC.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Este 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, así como en el Laboratorio de Metabolómica del CIC bioGUNE, Derio, País Vasco, España.

4.1 Material

4.1.1 Reactivos

Cultivo celular: todos los materiales de cultivo celular fueron de la marca Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, E.U.A).

- Aminoácidos no esenciales (10mM 100X)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (ADMEM)
- L- Glutamina (200 mM 100X)
- Suero fetal bovino (FBS)
- Tripsina-EDTA (0.25%)

- Solución de antibiótico-penicilina-estreptomicina (100UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina)
- Buffer de fosfatos salino (PBS) 1X pH 7.4
- Colorante azul tripano 0.4%
- Dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich)
- Geneticina (Thermo Fisher Scientific)

Tratamientos:

- SAM (sal de p-toluensulfonato, A2408, Sigma Aldrich, St. Louis MO)
- PEG-IFN (Pegtron Peginterferon Alfa-2b, Schering-Plough)
- RBV (Sigma-Aldrich)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC, Sigma-Aldrich)
- MG132, inhibidor del proteasoma (Sigma-Aldrich)
- 3-deaza adenosina (3-DZA)
- Actinomicina D (act D)
- Cicloheximida (CHX)

Anticuerpos:

- anti-NS5A (ab20342, Abcam)
- anti-Cu-Zn superóxido dismutasa-1 (SOD1) y anti-Mn superóxido dismutasa 2 (SOD2) (Santa Cruz Biotechnology)
- anti-Tiorredoxina 1, anti-MAT1, anti-MAT2, anti-STAT1 y anti-PKR (Abcam)

- anti-catalasa (Sigma Aldrich)
- anti-ubiquitina (sc-8017, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-dimetil argininas (DMA, Abcam)
- anti-actina MAb (MP Biomedicals, Aurora, IL, E.U.A)
- anti-ratón y anti- conejo (Promega, Madison, WI, E.U.A)
- anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology)

Ensayos:

- MTT (Cell Proliferation kit I, Roche, Mannheim, Alemania)
- TBS/tween (Tris buffer salino con tween 0.1%)
- Western Blotting Chemiluminescence Luminol (Santa Cruz Biotechnology)
- Trizol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, E.U.A)
- Kit de síntesis de cDNA de alta capacidad, Sybr Green PCR master mix, taqman universal PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.UA.)
- Human GAPDH Endogenous Control (VIC®/MGB probe, 4326317E) y Human ACTB (Beta Actin) Endogenous Control (FAM™/MGB probe, 4333762T) (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A)
- Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, D6883 Sigma-Aldrich)
- MitoSOX, red mitochondrial superoxide indicator (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, E.U.A)

- Solución salina balanceada de Hank (HBSS, Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, E.U.A))
- DAPI (Sigma-Aldrich)
- Ensayo de cuantificación de GSH (Cayman, Cat # 703002; Ann Arbor, MI)
- 2-vinilpiridina (Sigma-Aldrich)
- Metanol, ácido acético, acetronitrilo, ácido fórmico, formato de amonio (Sigma-Aldrich)
- Columna de amida BEH de 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m (Waters)
- Reactivo de Bradford (Bio-rad)
- Péptido sustrato para actividad de quimotripsina Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo BML-P802-0005)
- HEPES pH 7.5, NaCl, EDTA, 1% Tritón X-100, ATP (Sigma-Aldrich)
- Agua MiliQ estéril

4.1.2 Equipo

- Termociclador 7500 Fast Real time PCR system (Applied Biosystems)
- Lector de microplacas GloMax®-Multimode Reader. (Promega, Madison, WI, E.U.A)
- Microscopio Upright Fluorescent Microscope (Axioimager D1, Zeiss)
- Espectrofotómetro XMark TM de microplacas (Bio-Rad)
- Sistema UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, Acquity, Waters, Manchester)

- Espectrómetro de masas (EM) de tiempo de vuelo (ToF EM, SYNAPT G2, Waters)
- Lector de placa SpectraMax M2 (Molecular Devices, CA, E.U.A)

4.2 Métodos

4.2.1 Estrategia general

En el presente trabajo se planteó una estrategia experimental general que consistió en las siguientes actividades: evaluación de la replicación y expresión del VHC, participación de la vía de respuesta a estrés oxidativo, evaluación de la vía del proteasoma, evaluación de la metilación total de proteínas, participación de la vía de señalización por IFN, el resumen de experimentos realizados se muestra en la figura 6.

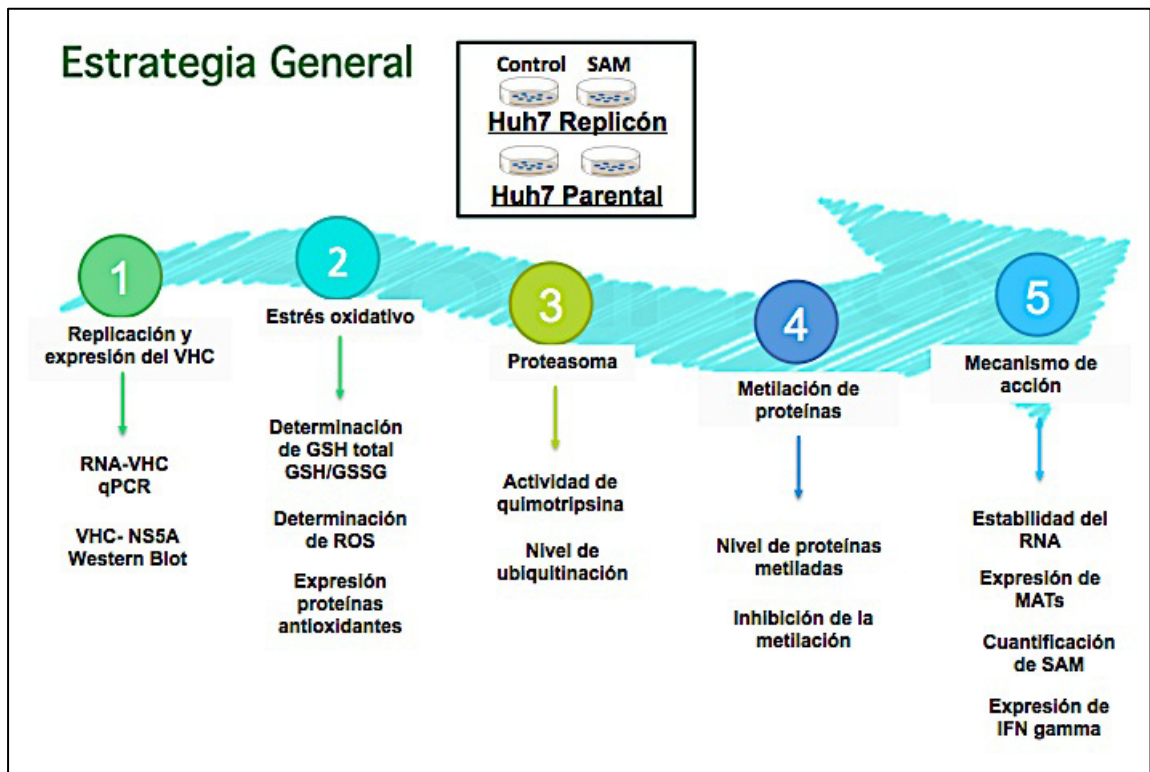


Figura 6. Estrategia experimental.

4.2.2 Cultivo de células y tratamiento con SAM.

Se utilizó una línea celular de hepatoma humano, Huh7-VHC replicón, conteniendo un replicón subgenómico del VHC genotipo 1b, que expresa las proteínas no estructurales del VHC³⁹. Además se utilizó la línea celular Huh7 parental, que no contiene las proteínas virales, como línea control. Las células fueron cultivadas en medio ADMEM suplementado con 2% de SBF, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de glutamina y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y en el caso de las células Huh7-VHC replicón, además se adicionó geneticina a una concentración de 0.5 mg/mL (como agente de

selección), la cual fue retirada al iniciar los tratamientos. Fueron mantenidas en una atmósfera de CO₂ del 5% a 37° C, en condiciones de esterilidad. Para los diferentes tratamientos, las células se sembraron un día antes y luego fueron tratadas con SAM, definiendo este momento como tiempo cero, las células se incubaron durante diferentes tiempos y a partir de este esquema de tratamiento se realizaron los experimentos.

4.2.3 Ensayo de viabilidad celular para definir dosis no tóxica de SAM.

Las células Huh7-VHC replicón fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1.7×10^4 células, al día siguiente fueron tratadas con SAM en un rango de concentraciones de 1-5 mM. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT y el porcentaje de viabilidad se calculó mediante la comparación de las diferentes condiciones con las células no tratadas (100% de viabilidad).

4.2.4 Ensayo dosis respuesta.

Con la finalidad de establecer la concentración de SAM a utilizar para los ensayos posteriores, se realizó un ensayo de dosis-respuesta utilizando dos concentraciones de SAM, 0.5 y 1 mM, los tratamientos fueron durante 24, 48 y 72 h. El efecto de estas dosis se evaluó mediante la cuantificación del RNA del VHC por qPCR. Una vez fue definida las dosis a utilizar de SAM se procedió a montar los experimentos para extracción de proteínas y RNA para western blot y qPCR, respectivamente; cuantificación de ROS, GSH, SAM endógena y actividad del proteasoma.

4.2.5 Extracción de RNA.

El RNA total fue extraído a partir de células Huh7-VHC replicón en diferentes condiciones de tratamiento utilizando Trizol, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Ver anexos, protocolo 6). Los precipitados de RNA se lavaron una vez en etanol 75% y se resuspendieron en 30 μ L de agua libre de RNAsas.

4.2.6 Retrotranscripción y qPCR para la cuantificación del RNA de VHC y el mRNA de proteínas celulares.

El RNA obtenido se sometió a retrotranscripción utilizando un kit de síntesis de cDNA de alta capacidad de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Ver anexos, protocolo 7). Se utilizaron 300 ng de RNA para cada reacción de retrotranscripción, el cDNA fue cuantificado y se hicieron diluciones de 50 ng/ μ L. Los cDNAs fueron sometidos a qPCR para la detección de VHC, de cuatro proteínas antioxidantes: SOD1, SOD2, CAT y TRX1; de IFN γ , y de tres genes endógenos, Ribosomal 18S (RPS18), actina y GAPDH. Las amplificaciones se llevaron a cabo con 100 ng de cDNA por triplicado, utilizando los primers y sondas mostrados en la tabla 2. Para VHC, GAPDH y actina se utilizaron sondas de hidrólisis para detección, y para el resto de los genes se utilizó Sybr Green. Para la cuantificación de GAPDH y actina se utilizaron ensayos prediseñados comercialmente, llamados GAPDH Control endógeno humano y β -actina humana control endógeno. La expresión de actina, GAPDH y RPS18 se utilizó para normalizar la concentración de RNA (Ver anexos, protocolo 8).

Tabla 2. Oligos y sondas utilizadas para qPCR.

Gen blanco	Secuencia de primers (5'-3')
VHC	Forward: GCG TCT AGC CAT GGC GTT A Reverse: GGT TCC GCA GAC CAC TAT GG Sonda: FAM-CTG CAC GAC ACT CAT AC-NFQ
SOD1	Forward: AGG ACG TCA TCA ATT TCG AG Reverse: TGC CTC TCT TCA TCC TTT GG
SOD2	Forward: GGA ACG GGG ACA CTT ACA AA Reverse: CAC CCT CGT GCG AAT GAT GG
TRX1	Forward: CTG CTT TTC AGG AAG CCT TG Reverse: TGT TGG CAT GCA TTT GAC TT
CAT	Forward: TAA GAC TGA CCA GGG CAT C Reverse: CAA CAC TTG GTG AGA TCG AA
Mat 1	Forward: ACA TCG GAG TCT GTG GGA GA Reverse: CGG TCT TGC ACA CTG TCT CA
Mat 2	Forward: GGT AGC CTT GGA GCA ACA GT Reverse: CTG GTC TCC AGC ACC AAT GT
IFN γ	Forward: ACTGTCGCCAGCAGCTAAAA Reverse: TATTGCAGGCAGGACAACCA
RPS18	Forward: TGT GGT GTT GAG GAA AGC AG Reverse: AAG TGA CGC AGC CCT CTA TG

4.2.7 Extracción de proteínas e inmunotransferencia.

Se realizó el análisis de 8 proteínas y dos genes endógenos que permitieron responder las diferentes preguntas planteadas en este proyecto. En general, para estos ensayos se sembraron 3×10^5 células en placas de 6 pozos, se les

expuso al tratamiento mencionado previamente y se extrajo la proteína total a las 0, 24, 48 y 72 h post-tratamiento, utilizando un buffer de lisis de proteínas (Ver anexos, protocolo 9). Después, el lisado celular se incubó por 20 min en hielo, se centrifugó, y se colectó el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total por el método de Bradford. Los extractos cuantificados se conservaron a -80°C hasta su uso. Cantidades iguales de proteínas se separaron en un SDS-PAGE al 12% y fueron transferidas a membranas de PVDF (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania). Las membranas se incubaron con uno de los siguientes anticuerpos: anti-NS5A, anti-SOD1, anti-SOD2, anti-TRX1, anti-MAT1, anti-MAT2, anti-STAT1, anti-PKR, anti-CAT, anti-ubiquitina o anti-actina MAb. Después de lavar con TBS/tween, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano, anti-IgG de ratón, anti-IgG de conejo o anti-IgG de cabra. La detección se realizó usando el reactivo Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent. Se realizó cada experimento por triplicado, y el análisis densitométrico fue hecho para cuantificar la expresión relativa de cada proteína detectada con el software ImageJ versión 1.46r 2011.

4.2.8 Cuantificación de ROS.

Se evaluó el nivel de ROS en citosol y en mitocondria mediante dos métodos, por espectroscopía de fluorescencia e inmunofluorescencia, respectivamente.

- **Espectroscopía de fluorescencia**

Para el ensayo a nivel citosol se cuantificaron los peróxidos totales; se utilizaron células Huh7 parental y VHC replicón, 2×10^4 células se incubaron

con SAM 1 mM a diferentes tiempos (0, 5, 1, 3, 12, 24 y 48 h). Los niveles de ROS se evaluaron mediante el ensayo de DCFH-DA, que consiste en la exposición de las células tratadas y no tratadas al agente fluorogénico DCFH-DA, el cual se internaliza en la célula, pierde el grupo diacetato, los peróxidos presentes en el citosol oxidan la molécula lo que ocasiona la formación de un compuesto que emite fluorescencia, la cual es directamente proporcional a la cantidad de peróxidos totales presentes en la célula. La fluorescencia se midió a 503 nm y 530 nm, longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente, utilizando el lector de microplacas GloMax®-Multimode Reader. Se utilizó H₂O₂, 1 µM como control positivo de daño y PDTC, 5 µM como control antioxidante.

- **Inmunofluorescencia**

A nivel mitocondrial se cuantificó el nivel de ROS utilizando MitoSOX, compuesto fluorogénico que reacciona con los aniones superóxido en las mitocondrias. Las células tratadas y no tratadas con SAM, fueron expuestas al reactivo MitoSOX por 10 min a 37°C, previamente preparado a una concentración stock de 5 mM en DMSO, y posteriormente diluido en HBSS 1X a una concentración final de 2.5 µM. De esta solución final se utilizó 1 mL para cada portaobjetos, protegiendo estos de la luz. A continuación se lavaron los portaobjetos 3 veces con HBSS a 37°C. Las preparaciones se fijaron con metanol, se tiñeron los núcleos con DAPI y fueron tomadas las fotografías con el microscopio Upright Fluorescent Microscope (Axioimager D1).

4.2.9 Cuantificación de Glutación total y relación GSH/GSSG.

La detección de GSH (glutación reducido) y GSSG (glutación oxidado) se realizó utilizando un ensayo de Cayman Chemicals, que consiste en un método de reciclamiento enzimático (método de reciclamiento de Ellman). El ensayo utiliza la glutación reductasa, para la cuantificación de GSH; en esta reacción, el grupo sulfhidrilo del GSH reacciona con el ácido 5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobenzoico (DTNB, reactivo de Ellman), y produce ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) de color amarillo. A la par se produce GSTNB, un compuesto intermedio entre GSH y TNB, el cual es reducido por la glutación reductasa para reciclar el GSH y producir mas TNB. La relación de la producción de TNB es directamente proporcional a esta reacción de reciclamiento, que además es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra. Se lee la absorbancia del TNB a 405-414 nm para obtener la estimación de la concentración de glutación en la muestra. El GSH se oxida rápidamente a su dímero disulfuro GSSG, éste se produce durante la reducción de los hidroperóxidos por la glutación peroxidasa. GSSG se reduce a GSH por la glutación reductasa. Debido a que en el ensayo se utiliza la glutación reductasa, se miden GSH y GSSG, por lo que la medida que se obtiene refleja el GSH total. Para medir el GSSG se realiza un paso de derivatización del GSH en la muestra, de esta manera solo se mide el GSSG presente y se calcula la cantidad de GSH, mediante una sustracción del dato obtenido en el ensayo de GSH total. Células Huh7 parental y VHC replicón fueron tratadas con SAM 1 mM, durante 1, 2, 6, 12 y 24 h. Las células se lisaron mediante ciclos de congelación y descongelación en PBS 1X. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta que se realizó el

ensayo (no mas de 1 día). Los sobrenadantes tenían una concentración baja de proteína (<1 mg/mL) y carecían de partículas, por tal razón se realizó el ensayo sin la necesidad de un proceso de desproteización, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. GSSG se midió mediante la derivatización de GSH con 2-vinilpiridina. El espectrofotómetro XMark TM de microplacas se utilizó para la medida de absorbancia usando un filtro de 415 nm.

4.2.10 Determinación de SAM por UPLC.

Se realizó un análisis semi-cuantitativo para la determinación de SAM en las células Huh7-VHC replicón con y sin tratamiento mediante UPLC (Acquity, Waters, Manchester) acoplado a un espectrómetro de masas, siguiendo el método descrito por van Liempd⁹⁸. Se sembraron 2×10^6 células en placas de 100 mm por triplicado para los tratamientos con SAM 1 mM y para las células no tratadas. Se realizó el raspado de cada placa correspondiente a 24, 48 y 72 h de tratamiento. Para el raspado y obtención del paquete celular, se utilizó 1 ml de PBS 1X frío por cada placa, preparado con agua libre de nucleasas. Se rasparon las células con un gendarme de goma o scrapper, y se recuperaron en tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 min y se retiró el sobrenadante teniendo cuidado de retirar el mayor volumen posible, las muestras se trabajaron siempre en hielo y refrigeración y se congelaron los paquetes celulares obtenidos en hielo seco para después ser almacenados a -80 °C, hasta su uso. Los paquetes celulares fueron homogenizados en 500 µL de una mezcla agua/metanol fría (50/50 v/v %) mas 10 mM de ácido acético con un homogenizador de tejido (Precellys) en 1 x 20" ciclos a 6000 rpm. A

continuación, 400 μL del homogenado fueron transferidos a un nuevo tubo y mezclados a 1400 rpm por 30 min a 4 °C. Las muestras fueron centrifugadas por 15 min a 13000 rpm a 4 °C. Se colectaron 150 μL del sobrenadante y fueron transferidos a tubos nuevos fríos y almacenados a -80°C por 20 min. Los sobrenadantes fueron evaporados con un sistema de vacío en aproximadamente 3 h. Los paquetes celulares resultantes fueron resuspendidos en 100 μL de una mezcla de agua/acetonitrilo/ácido fórmico (40/60/0.1 v/v/v %). Las muestras fueron medidas con un sistema UPLC, acoplado a un EM de tiempo de vuelo. Se utilizó una columna de amida BEH de 2.1 x 100 mm, 1.7 μm , estabilizada a 40°C, para separar los analitos antes de introducirlos al EM. El solvente A (fase acuosa) consistió en 99.5% agua, 0.5% ácido fórmico y 20 mM de formato de amonio, mientras que el solvente B (fase orgánica) consistió en 29.5% agua, 70% acetonitrilo, 0.5% ácido fórmico y 1 mM de formato de amonio (Ver anexos, protocolo 17). Todas las muestras fueron inyectadas al azar. La curva de calibración, incluyendo 6 blancos, fueron inyectados antes y después del set de muestras. Después de cada 9 inyecciones, una muestra para control de calidad fue inyectada. Todas las muestras fueron inyectadas por duplicado. Las concentraciones de las muestras fueron calculadas con la curva de calibración. Las concentraciones fueron convertidas a cantidad de analito por contenido proteico (pmol/ μg de proteína), tomando en cuenta la pérdida de analito debida a la manipulación de la muestra. El contenido de proteína fue cuantificado mediante un ensayo de Bradford.

4.2.11 Ensayo de actividad del proteasoma de tipo quimotripsina.

El ensayo *in vitro* de la actividad de quimotripsina del proteasoma 26S, consistió en una reacción de fluorescencia basada en la liberación del fluoróforo 7-amido-4-metilcumarina (AMC) del péptido sustrato, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC; la cual se lleva a cabo si la actividad de tipo quimotripsina está presente en las células. La señal obtenida es directamente proporcional a la actividad catalítica de tipo quimotripsina del proteasoma. Para este ensayo, las células Huh 7 VHC-replicón fueron recolectadas, lavadas dos veces con PBS 1X, y homogenizadas con buffer de lisis (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 y 2 mM ATP) sin inhibidor de proteasas. Después de mezclar a 4°C por 30 min, los lisados se centrifugaron a 10, 000 g por 10 min y los sobrenadantes fueron colectados. Se realizó una cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA), y se utilizaron 20 µg de proteína para el ensayo de actividad de proteasoma por cada condición en una placa de 96 pocillos y adicionando 20µM del sustrato fluorogénico comercial. El AMC liberado por la hidrólisis fue monitoreado cada 30 min de adicionado el sustrato por 3 h a 380 nm excitación y 460 nm emisión en un lector de placa SpectraMax M2. Se cuantificó la actividad de quimotripsina del proteasoma a las 12-72 h de células tratadas y no tratadas con SAM; además se utilizó MG132, un inhibidor del proteasoma, como control positivo de inhibición de la actividad del proteasoma, este reactivo fue añadido a las células en medio de cultivo a una concentración de 1 µM, al mismo tiempo del inicio del tratamiento con SAM, se realizó además una combinación de los tratamientos de SAM y MG132. Los

resultados se muestran en unidades relativas de fluorescencia (RFU, del inglés, *relative fluorescence units*).

4.2.12 Metilación total de proteínas e inhibición de las reacciones de metilación

Con la finalidad de investigar el posible efecto en la metilación al adicionar el tratamiento con SAM a las células Huh7-VHC replicón, se realizó una extracción de proteína total y un western blot como se indicó previamente. Se utilizó un anticuerpo anti-DMA, dirigido contra las dimetil argininas presentes en las proteínas metiladas, y se evaluó el perfil de metilación diferencial de proteínas en células con y sin tratamiento con SAM.

Por otro lado, se realizó un experimento utilizando el compuesto 3-DZA a una concentración de 20 μM por 24 h, un inhibidor de las reacciones de transmetilación en células somáticas. El efecto se evaluó por western blot de la proteína NS5A utilizando un anticuerpo anti-NS5A como se describió previamente.

4.2.13 Estabilidad del RNA y traducción celular

Fue de nuestro interés además investigar si el efecto de SAM sobre la replicación viral sucedía a nivel de modificación en la estabilidad del RNA viral o se trataba de alteraciones en la traducción de proteínas celulares, por tal motivo, se planteó un experimento utilizando act D, inhibidor de la transcripción total en la célula, y CHX, inhibidor de la traducción en las células. Por un lado, se sembraron células Huh7-VHC replicón (1.5×10^5 células) que fueron incubadas

con 1 mM de SAM, un grupo de ellas fue tratado con act D a una concentración de 4 µg/ml, o CHX a una concentración de 50µg/ml por 2 h previas a la adición de SAM. Las células fueron cosechadas 16 h después y el nivel de RNA del VHC fue cuantificado por qPCR.

Por otro lado, se evaluó también el efecto de la inhibición de la traducción celular en presencia de SAM, utilizando CHX. Para este fin, se sembraron 3 x 10⁵ células en placas de 6 pozos, se les expuso al tratamiento de CHX durante 4 h previas a la adición de SAM. Se extrajo la proteína total a las 16, 24 y 72 h post-tratamiento. Se evaluó el efecto de la inhibición de la traducción celular, en la expresión de la proteína NS5A mediante western blot.

4.2.14 Análisis estadístico y software utilizados

Los experimentos se realizaron al menos tres veces y cada condición por triplicado. Los resultados fueron evaluados por ANOVA o t student utilizando el programa SPSS versión 17.0 se consideró una diferencia significativa, cuando el valor de *p* fue menor a 0.05 ó 0.01.

Para el análisis de imágenes generadas de la técnica de inmunofluorescencia, se utilizó el software FRIDA (del inglés: FRamework for Image Dataset Analysis), fue descargado de la siguiente liga: <http://tmaj.pathology.jhmi.edu/frida/>. Para las densitometrías de los western blots realizados se utilizó el software ImageJ versión 1.46r 2011.

V. RESULTADOS

5.1 SAM disminuye la expresión del VHC a nivel transcripcional y traduccional

5.1.1 Viabilidad celular

Se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante la técnica de MTT, es un ensayo colorimétrico que se basa en la reducción del colorante de tetrazolio, MTT, a su sal de formazán insoluble, dando un color púrpura, reflejando así el número de células activas metabólicamente y por lo tanto, viables (proliferación celular). Se utilizaron 3 concentraciones de SAM, 1 mM, 2.5 mM y 5 mM. La viabilidad de las células tratadas fue mayor al 80% en todas las concentraciones usadas y en los 3 tiempos evaluados, comparando con el control sin tratamiento (100% de viabilidad), siendo las concentraciones de 1 y 2.5 mM las que se mantuvieron por encima del 90% de viabilidad (figura 7).

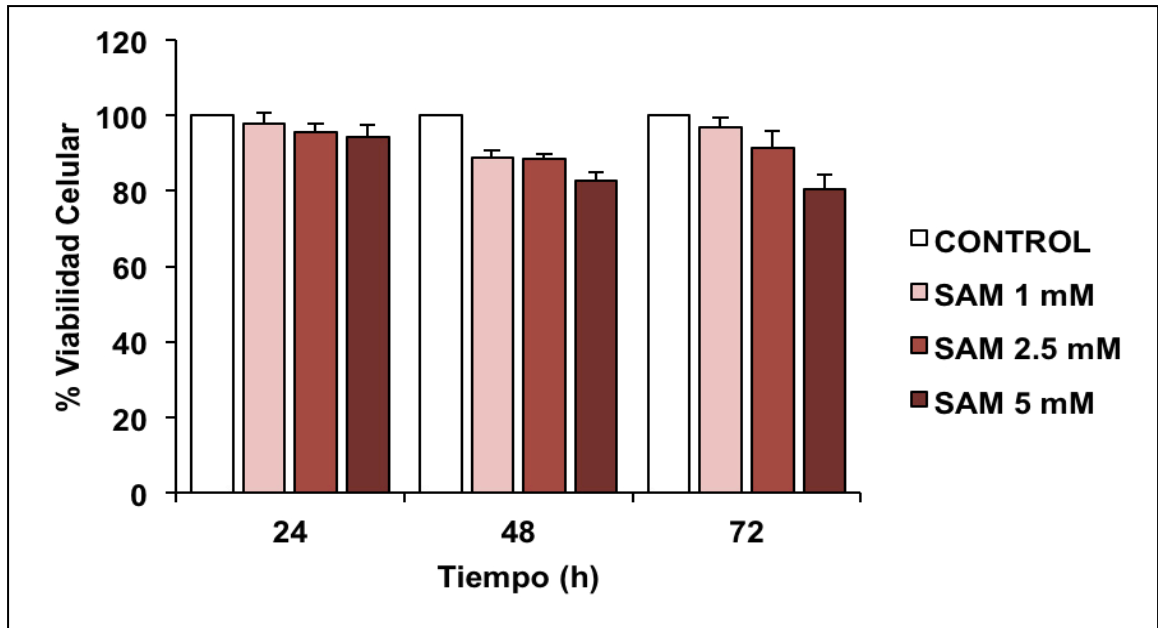


Figura 7. Ensayo de viabilidad celular. CONTROL: células no tratadas, SAM: células tratadas con SAM (1, 2.5 y 5 mM).

5.1.2 El efecto de SAM sobre el RNA del VHC es dosis-tiempo dependiente.

Con la finalidad de establecer la concentración de SAM a utilizar para los ensayos posteriores, se realizó un ensayo de dosis-respuesta utilizando dos concentraciones de SAM, 0.5 y 1 mM. Estas concentraciones fueron seleccionadas con base en la observación del ensayo de viabilidad y en la dosis de SAM utilizada en pacientes. El efecto de estas dosis se evaluó mediante la cuantificación del RNA-VHC por qPCR. Se observó disminución de la expresión del RNA-VHC en las dos concentraciones utilizadas, el efecto fue tiempo-dependiente; y fue mayor a la concentración de 1 mM de SAM con una disminución de 50-60% en los 3 tiempos evaluados.

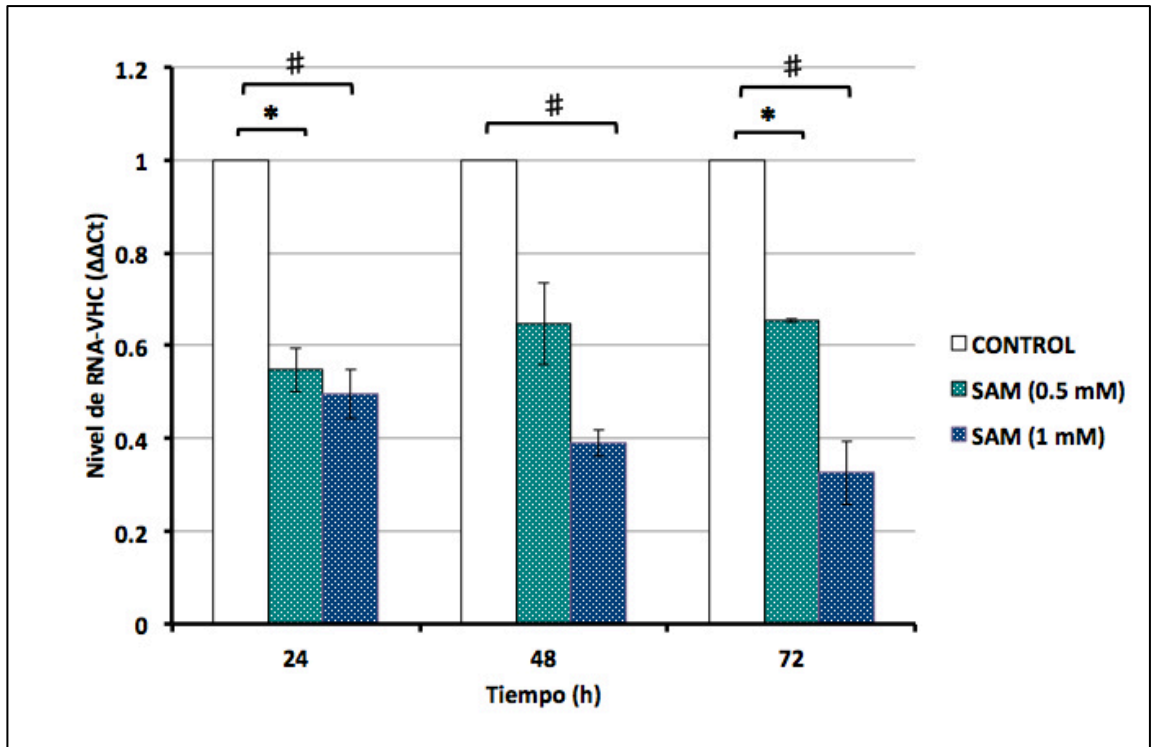


Figura 8. Ensayo dosis-respuesta de expresión de RNA-VHC por qPCR. CONTROL: células que no fueron tratadas con ninguno de los agentes utilizados, SAM: células que solo fueron tratadas con SAM 0.5 mM o 1 mM. * $p \leq 0.01$ comparación SAM 0.5mM vs. CONTROL. # $p \leq 0.01$ comparación SAM 1mM vs. CONTROL.

5.1.3 SAM disminuye la replicación del VHC y la expresión de la proteína no estructural NS5A.

Se realizó el análisis de la expresión del RNA-VHC, por medio de qPCR, para lo cual se sembraron células Huh7-VHC replicón a una densidad de 2×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos, al día siguiente, se inició el tratamiento con SAM 1mM, y enseguida se adicionó el tratamiento de PEG-IFN (1000 UI/ml) y RBV (50 μ M), se extrajo RNA total una vez cumplido el tiempo de tratamiento, 0, 24, 48 y 72 h. Se sintetizó el cDNA por retrotranscripción y se prosiguió con la cuantificación del RNA viral por qPCR. El análisis se hizo por

medio de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$, dando al control sin tratamiento el valor de 1. El tratamiento con PEG-IFN+RBV, utilizado como control positivo de inhibición de la replicación del VHC, mostró la inhibición esperada a los diferentes tiempos evaluados. El nivel de RNA del VHC en presencia de SAM en monoterapia disminuyó a un 50% a las 24h y tal efecto fue tiempo dependiente, mostrando una inhibición de 60% a las 72h post-tratamiento. En la terapia combinada se observó un efecto aditivo de inhibición de la expresión del RNA-VHC (figura 9).

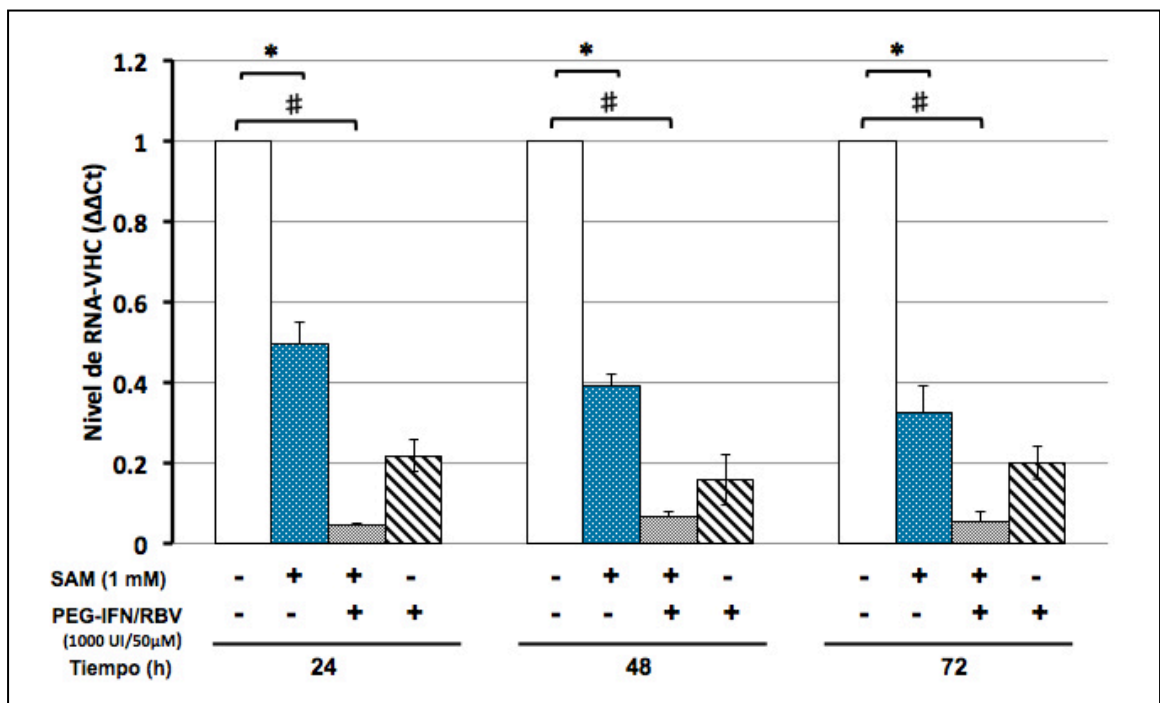


Figura 9. Expresión de RNA-VHC por qPCR. Se cuantificó el RNA-VHC mediante qPCR utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$, dándole el valor de 1 al control sin tratamiento. Se indica con un signo de - y/o + la adición de los diferentes tratamientos. Cada barra representa el promedio de 3 repeticiones. * $p \leq 0.01$ comparación SAM vs. Control. # $p \leq 0.01$ comparación SAM+PEG-IFN+RBV vs. Control.

Con la finalidad de determinar si el tratamiento con SAM modifica la expresión de las proteínas virales, se realizó un ensayo para extraer proteínas totales, se adicionó el tratamiento con SAM y/o tratamiento con PEG-IFN+RBV, se extrajo la proteína total a las 0, 24, 48 y 72 h posteriores al inicio del tratamiento. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (figura 10) y se procedió a realizar el western blot para detectar los niveles de la proteína viral NS5A usando como control de carga un anticuerpo contra β -actina. Se observó una disminución de la proteína NS5A de 40-60% durante los 3 tiempos evaluados, comparando con el control de células Huh7-VHC replicón sin tratamiento (figura 11 y 12), de esta manera se confirmó que el efecto es a nivel transcripcional y traduccional. En el control positivo, PEG-IFN+RBV, se observó el efecto de disminución esperado.

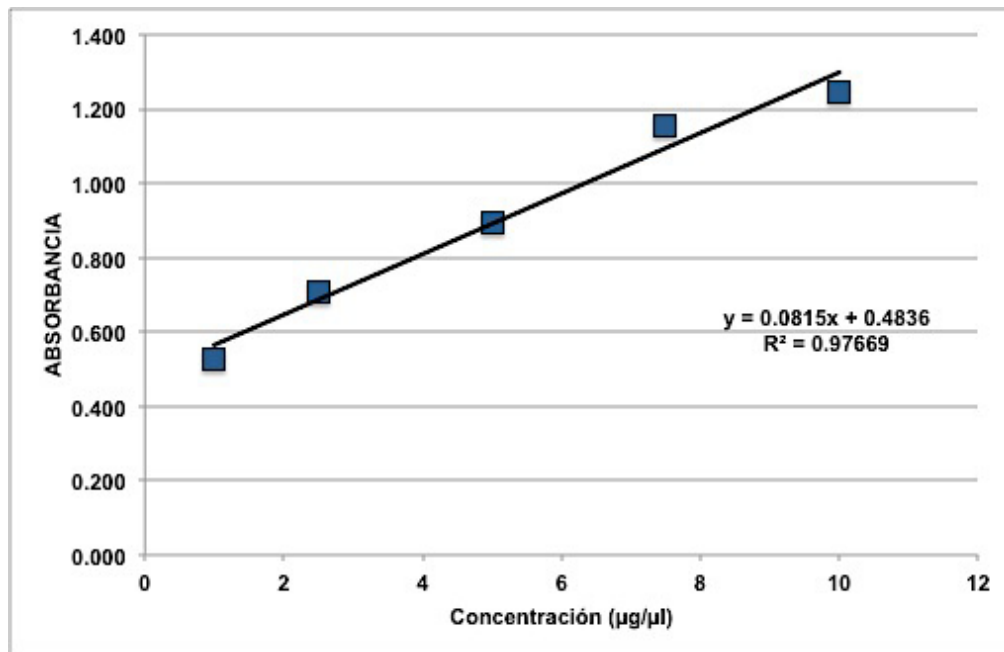


Figura 10. Curva de estándares para cuantificación de proteína por Bradford.

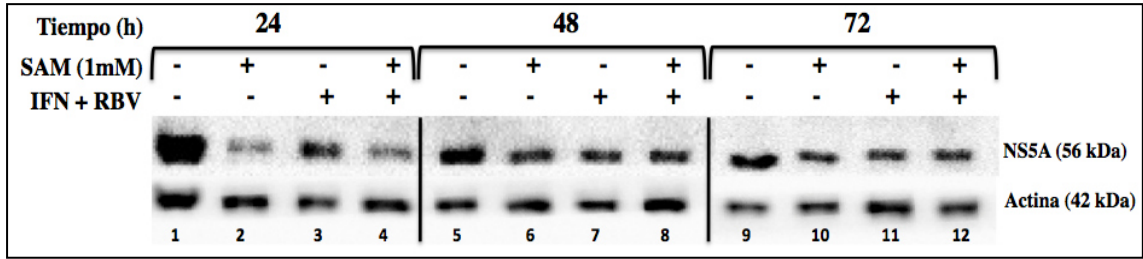


Figura 11. Western blot de la proteína no estructural NS5A y de β -actina. Imagen representativa de 3 repeticiones.

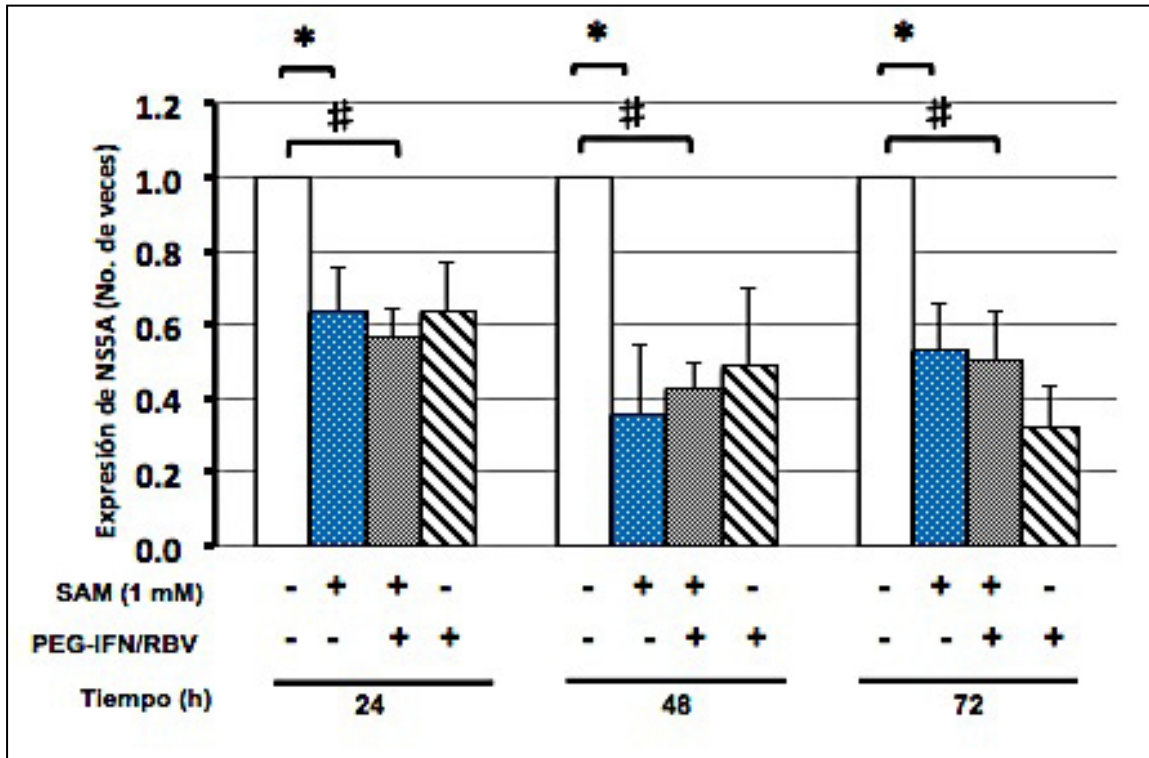


Figura 12. Densitometría correspondiente a 3 ensayos de western blot independientes para la proteína NS5A. Se indica con un signo de - y/o + la adición de los diferentes tratamientos. * $p \leq 0.01$ comparación SAM vs. Control. # $p \leq 0.01$ comparación SAM+PEG-IFN+RBV vs. Control.

5.2 SAM regula el sistema antioxidante de las células Huh7-VHC replicón y parental

5.2.1 SAM induce la síntesis de glutatión en células VHC replicón y parental.

Se evaluó la concentración de glutatión total por el método de reciclamiento de Ellman. Se sembraron 3×10^5 células en placas de 6 pozos, y se extrajo la proteína total (0-24 h). En presencia de SAM la síntesis de GSH se incrementa desde las 2 h post tratamiento en las células parentales, y en las células replicón desde las 6 h post tratamiento. En cuanto a la relación glutatión reducido/oxidado no se observaron cambios significativos durante los diferentes tiempos en el tratamiento (figura 13 y 14).

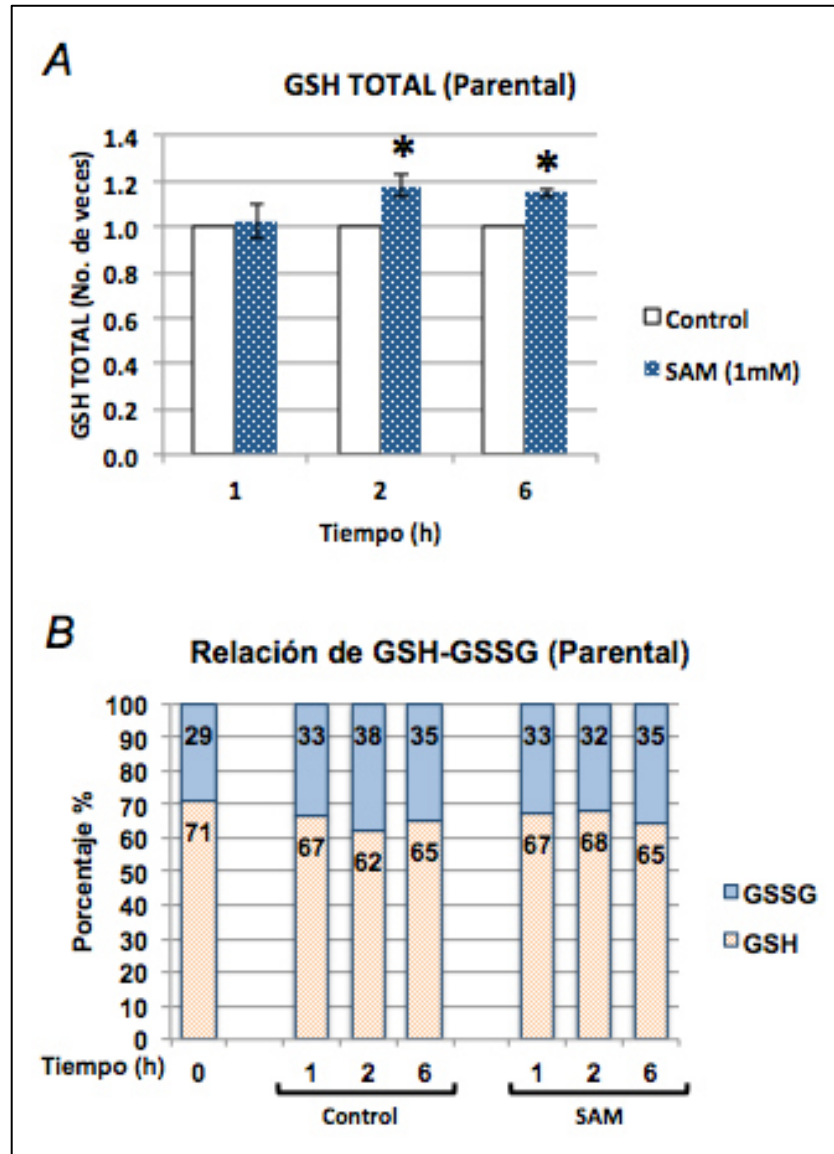


Figura 13. Cuantificación de GSH y GSSG en células Huh7 parental. A. Ensayo de cuantificación de glutatión total en células Huh7 parental y, B. La relación de glutatión reducido-glutatión oxidado.

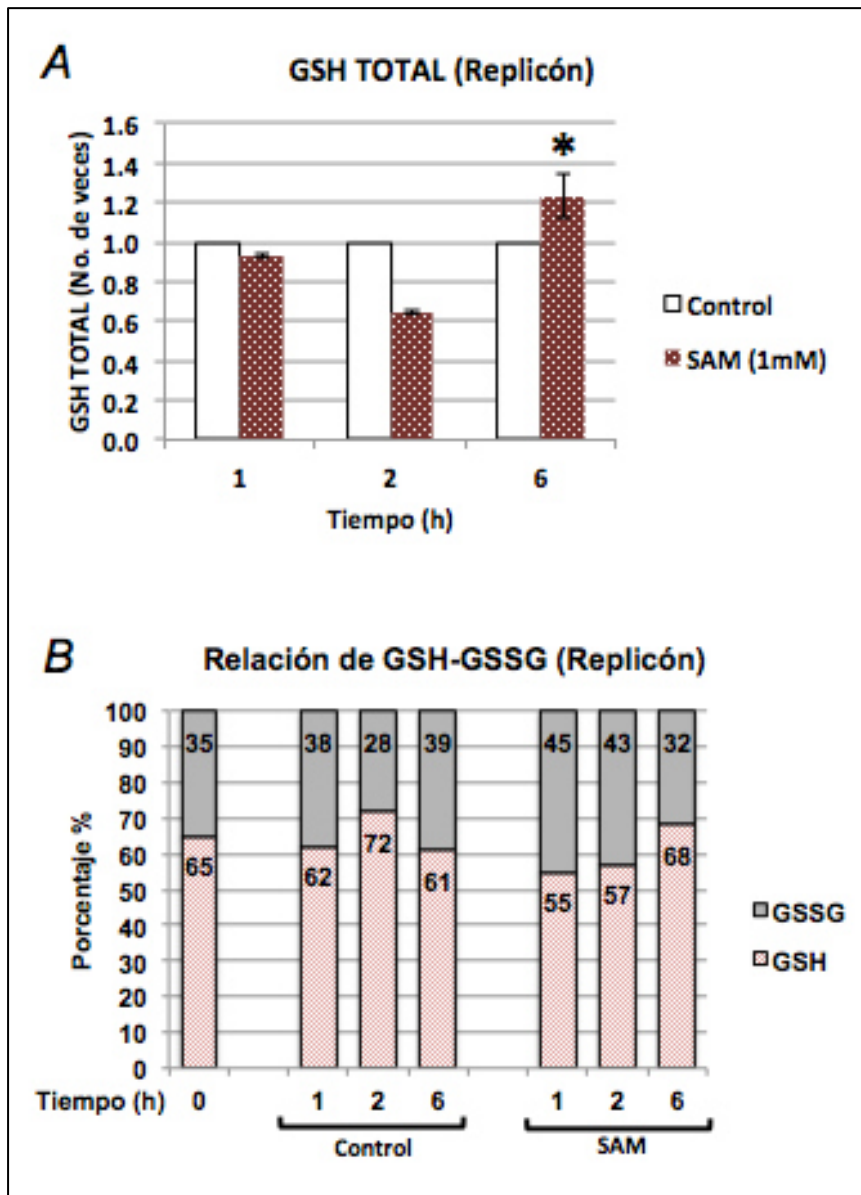


Figura 14. Cuantificación de GSH y GSSG en células Huh7-VHC replicón. *A*. Ensayo de cuantificación de glutatión total en células Huh7-VHC replicón y, *B*. La relación de glutatión reducido-glutatión oxidado.

5.2.2 SAM no modula a la producción de ROS en células que expresan VHC.

Por otro lado, se evaluó el nivel de ROS utilizando el método de la DCFH-DA. Se sembraron células Huh7-VHC replicón y parental que fueron tratadas y no tratadas con SAM 1mM; además, se trataron células con H₂O₂ como control positivo de daño y PDTC, como control positivo de actividad antioxidante. Los niveles de ROS fueron medidos a 0.5, 1, 3, 12, 24 y 48 h después del tratamiento, mediante la adición del reactivo DCFH 5μM y la toma de lectura usando espectroscopía de fluorescencia. Si bien, se observó el efecto negativo sobre ROS en las células tratadas con el antioxidante y además del aumento en la señal en el control de generación de ROS, H₂O₂; en las células tratadas con SAM no hubo disminución significativa de ROS durante los tiempos evaluados en las dos líneas celulares probadas, Huh7 con y sin las proteínas virales (figuras 15 y 16).

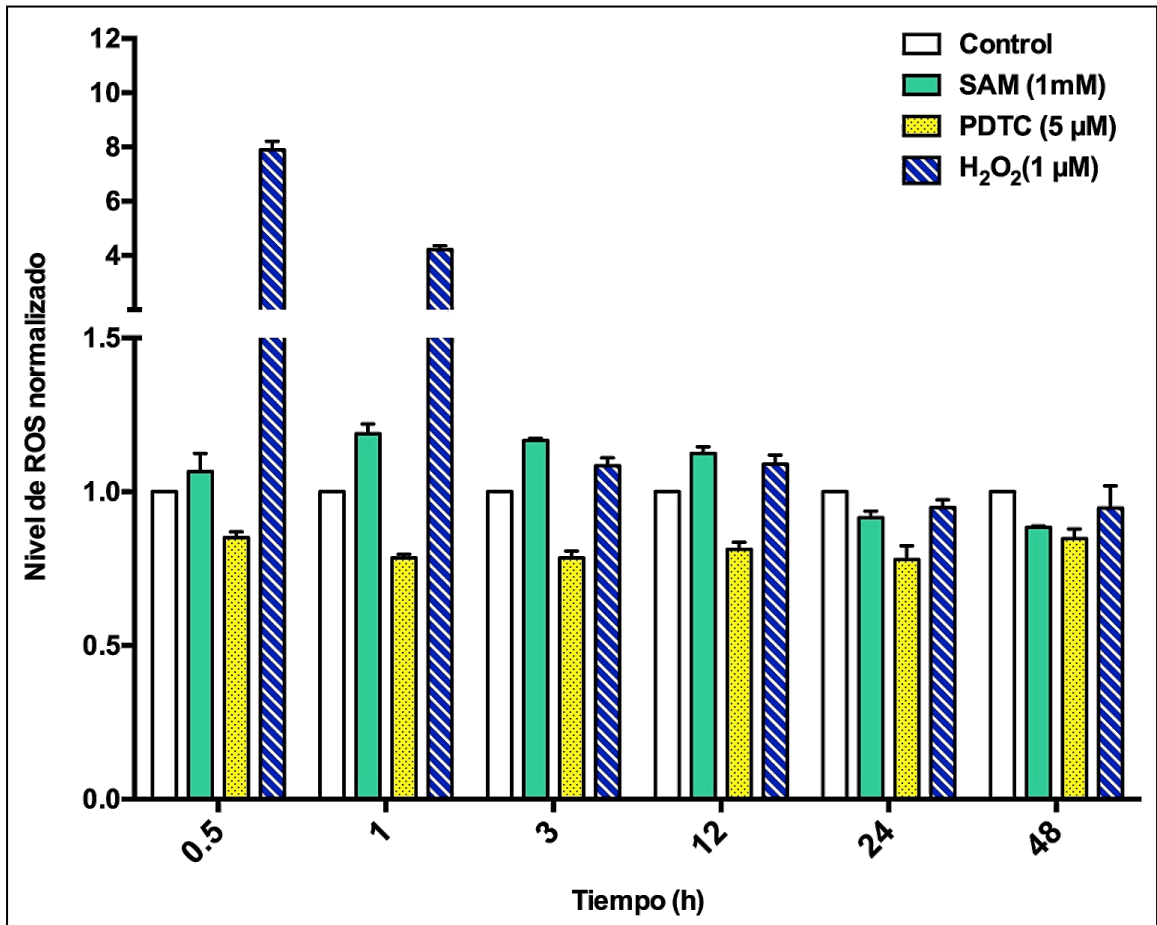


Figura 15. Nivel de ROS en células Huh7 parental. Tratamientos: SAM 1mM, PDTTC 5μM, H₂O₂ 1 μM, de 0.5 a 48 h, medido por el método de fluorescencia DCFH.

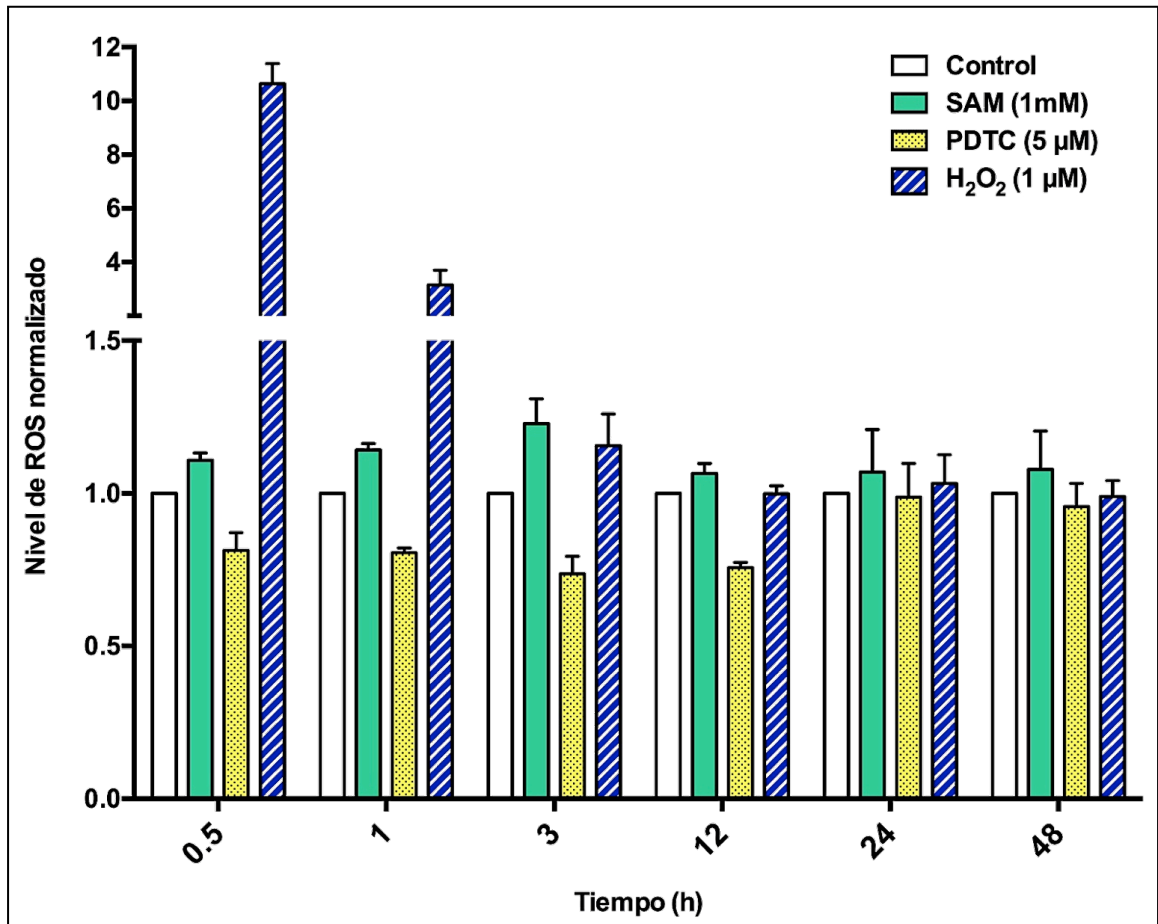


Figura 16. Nivel de ROS en células Huh7-VHC replicón. Tratamientos: SAM 1mM, PDTC 5μM, H₂O₂ 1 μM, de 0.5 a 48 h, medido por el método de fluorescencia DCFH.

Para evaluar las especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial, específicamente el anión superóxido, se sembraron células Huh7-VHC replicón y parental en placas de 6 pozos, donde previamente se colocaron cubreobjetos para posteriormente ser recuperados para su observación al microscopio. Se fijaron las células con metanol y posteriormente se adicionó el reactivo MitoSox, compuesto que reacciona con los aniones superóxido en la mitocondria y emite fluorescencia, se tiñeron los núcleos con DAPI, se observó la fluorescencia al microscopio y se capturaron las imágenes de los diferentes tratamientos a 2, 6 y 24 h (figuras 17 y 18).

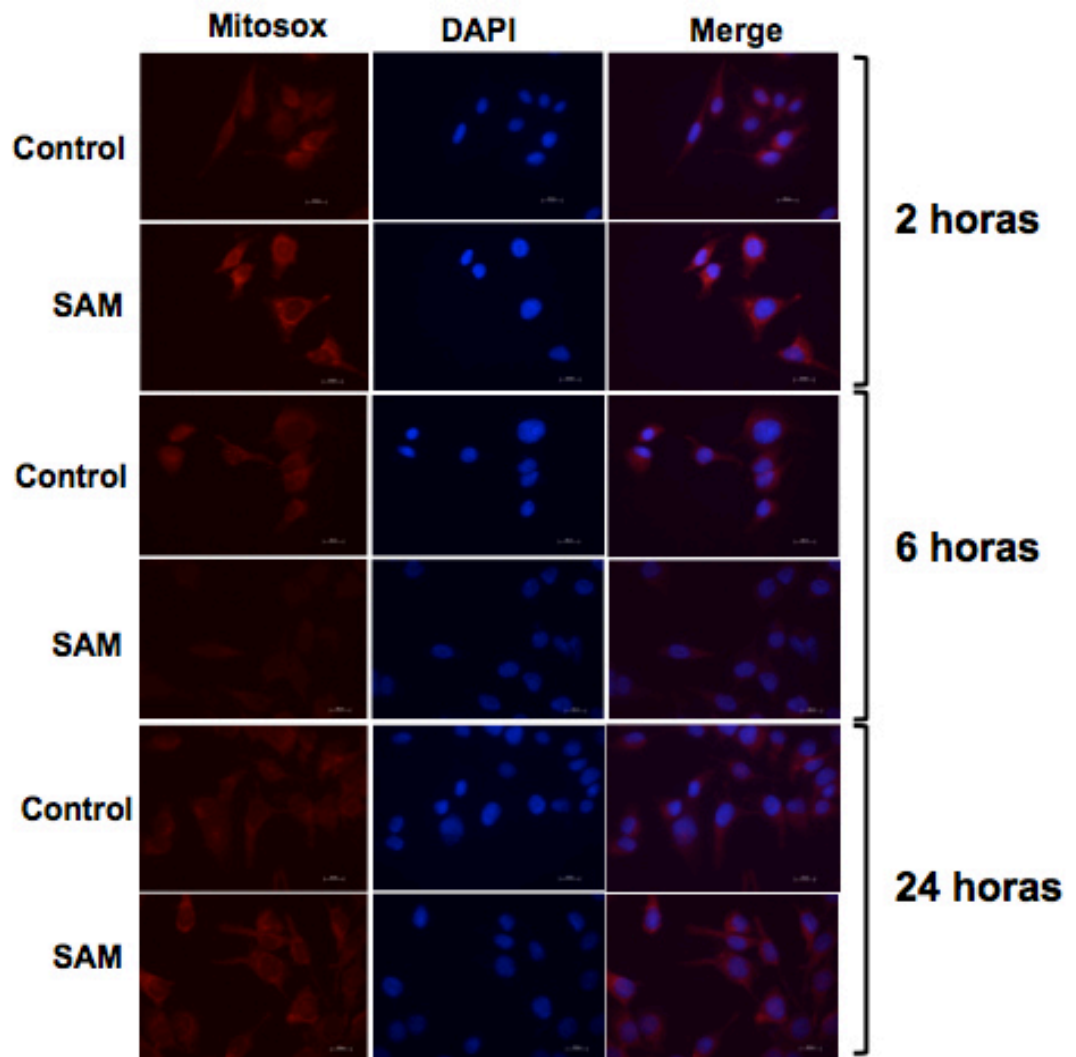


Figura 17. Imágenes correspondientes al ensayo de Mitosox en células Huh7 parental. Se muestran las comparativas de las 2, 6, y 24 h de tratamiento con SAM comparadas con el control sin tratamiento.

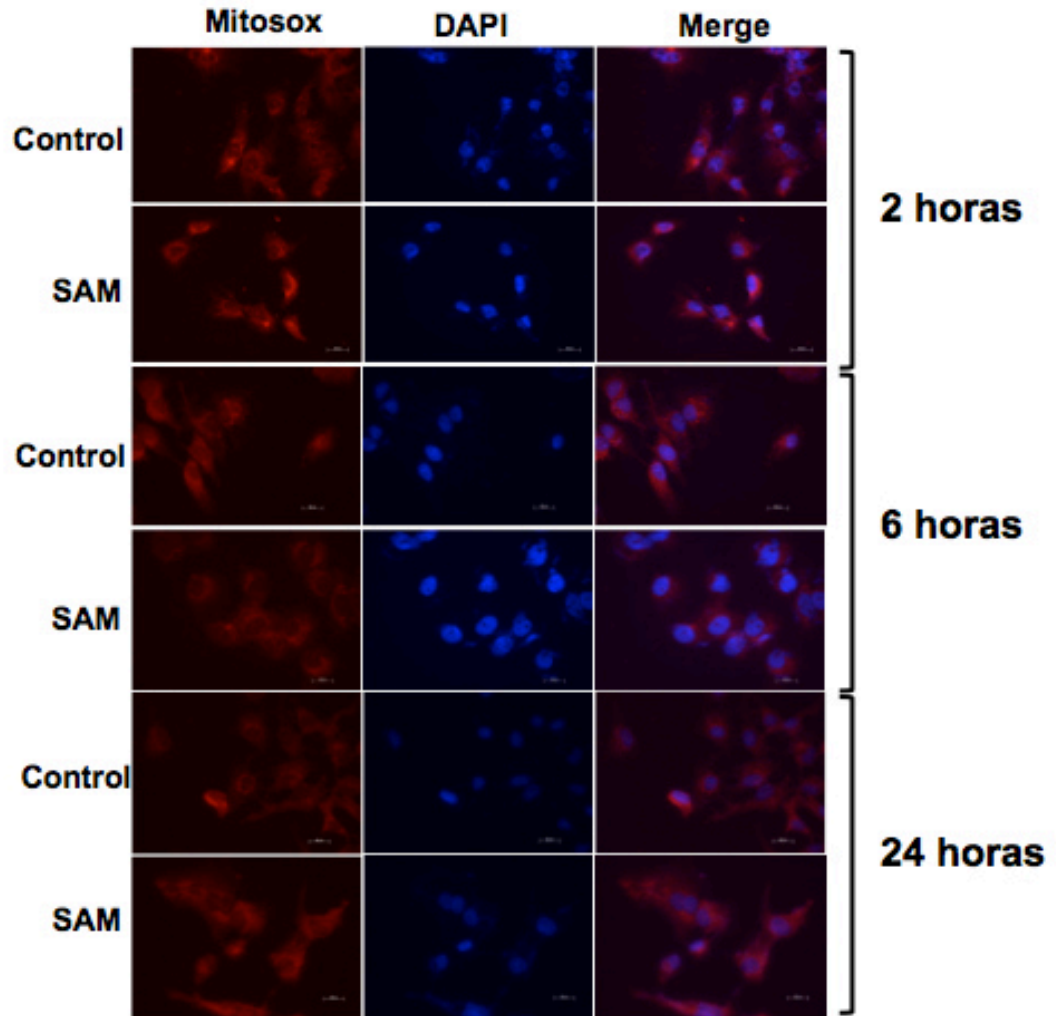


Figura 18. Imágenes correspondientes al ensayo de Mitosox en células Huh7-VHC replicón. Se muestran las comparativas de las 2, 6, y 24 h de tratamiento con SAM comparadas con el control sin tratamiento.

La fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de aniones superóxido en las mitocondrias de las células, se utilizó el programa FRIDA para realizar el análisis semi-cuantitativo. Se encontró que en las células Huh7 parentales que fueron tratadas con SAM hubo una disminución significativa a las 6 h de iniciado el tratamiento con SAM; en cambio, en las

células que expresan las proteínas virales, no hubo cambios en los tratamientos comparados con el control sin tratamiento (figura 19).

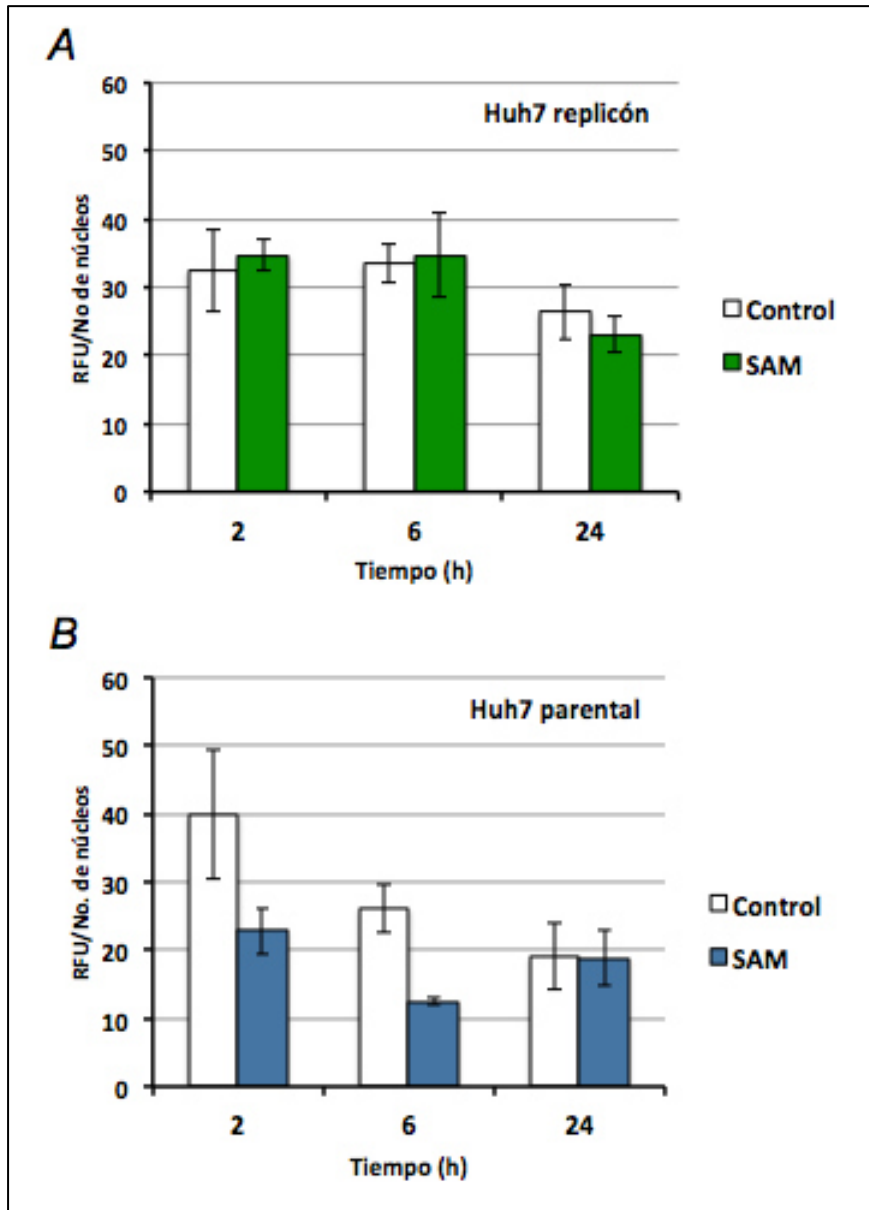


Figura 19. Análisis de imagen con el software FRIDA. Tomando en cuenta las unidades relativas de fluorescencia y normalizando con los núcleos. A. Análisis correspondiente a células Huh7-VHC replicón, B. Análisis correspondiente a células Huh7 parental. Control: células no tratadas, SAM: células tratadas con SAM 1mM.

5.2.3 SAM modula la expresión de SOD 1, SOD 2 y tioredoxina 1 a nivel transcripcional y traduccional.

Se realizaron ensayos para determinar el nivel de expresión de las proteínas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT y TRX1. El RNA total y proteínas fueron extraídos en cada tiempo, el cDNA fue sintetizado y posteriormente se realizó la qPCR para evaluar la expresión de dichos genes, utilizando primers específicos y mediante la química de detección de SYBR Green, los genes GAPDH y RPS18 fueron utilizados como genes de referencia para la normalización. Se construyeron curvas de estándares para calcular la eficiencia de la reacción de qPCR para los diferentes pares de primers a utilizar con la química de Sybr Green y determinar la concentración de cDNA a utilizar (figuras 20-23). Se utilizaron 5 puntos en la recta con un orden de dilución de 5, siendo las cantidades de cDNA utilizadas las siguientes: 2 μ g, 0.4 μ g, 0.08 μ g, 0.016 μ g y 0.0032 μ g, al obtener cada Ct o Cq, se graficó utilizando el log 2 de las concentraciones para obtener la pendiente, la cual se utilizó para calcular la eficiencia de la reacción.

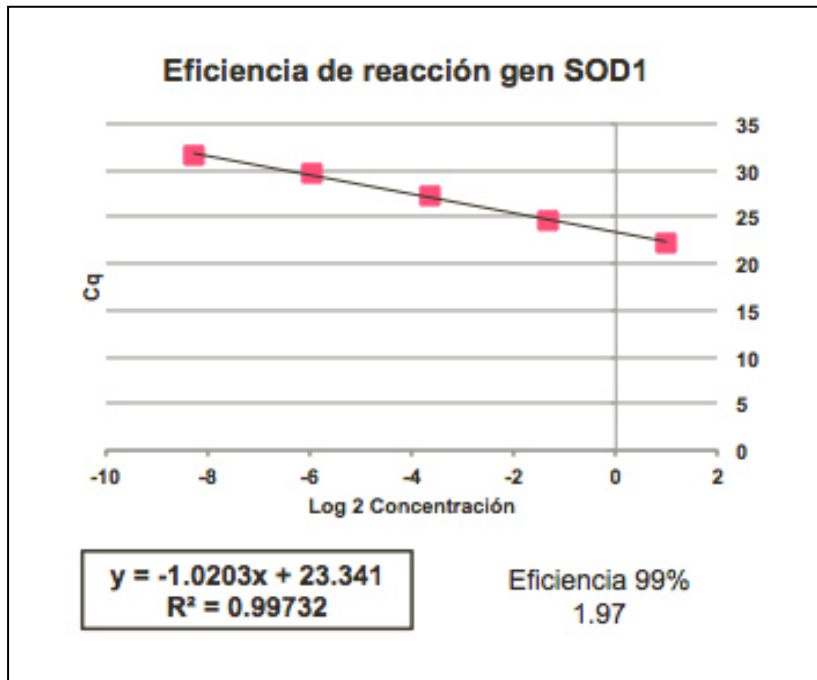


Figura 20. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para SOD1.

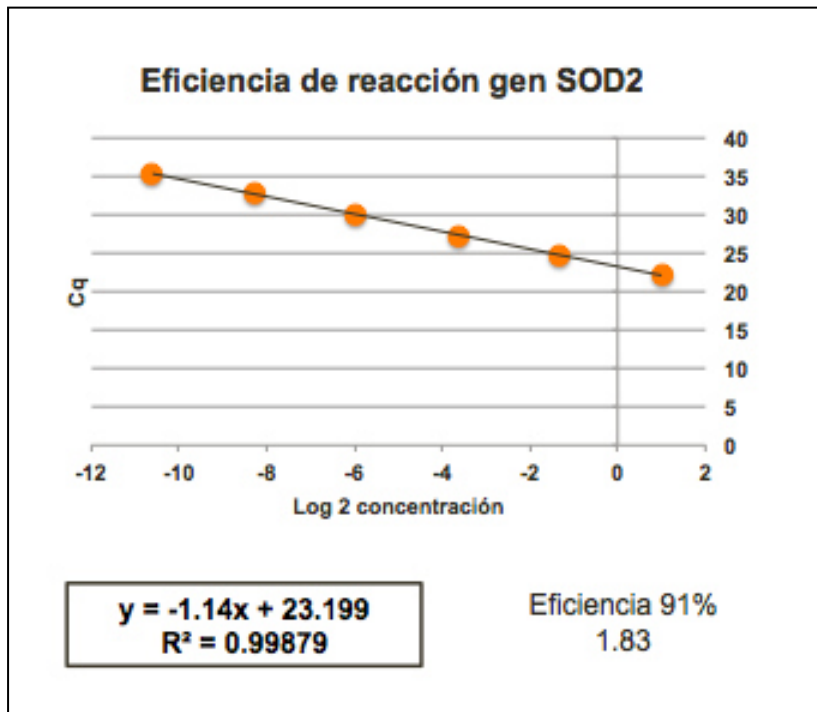


Figura 21. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para SOD2.

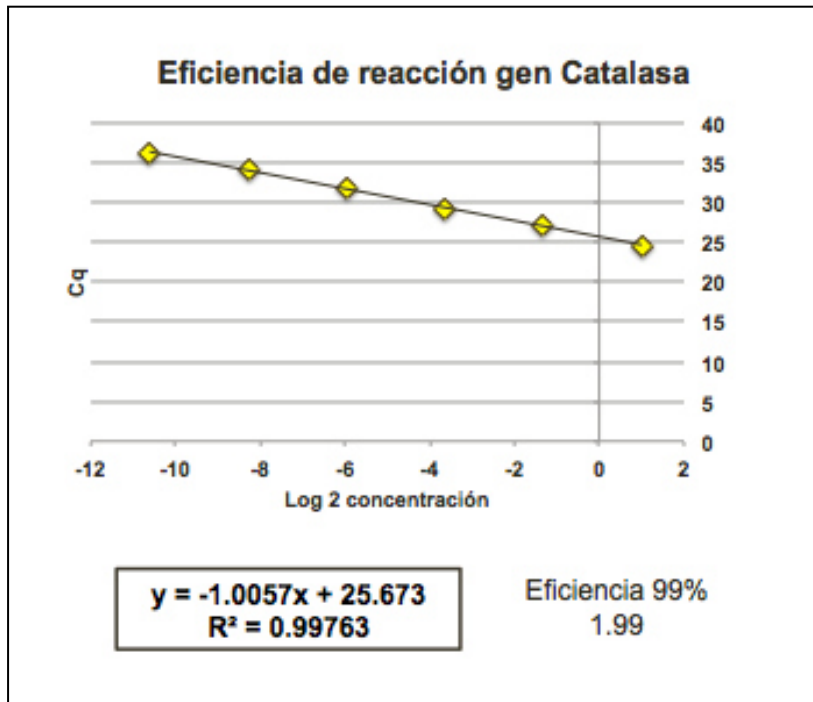


Figura 22. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para CAT.

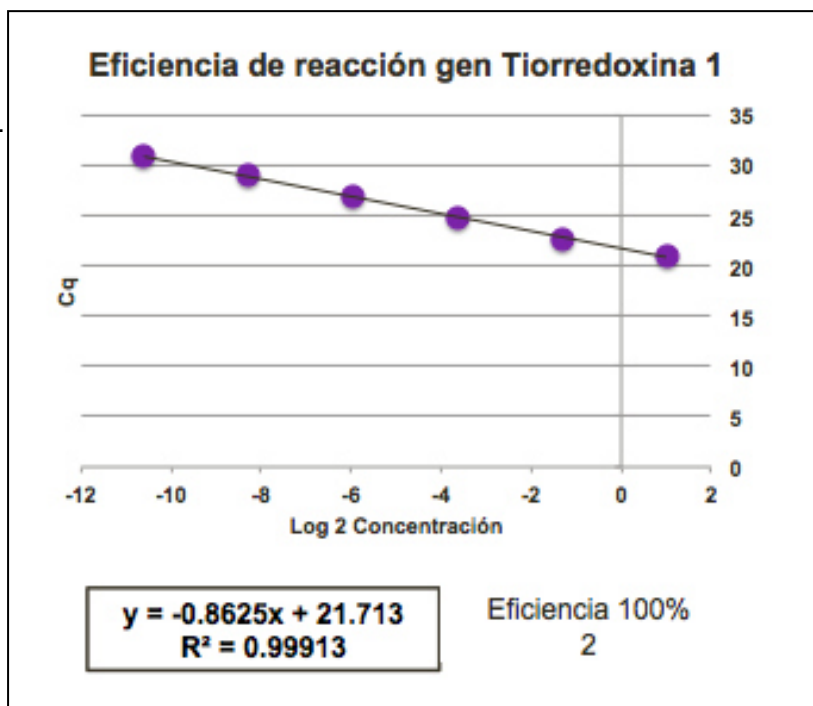


Figura 23. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para TRX1.

Una vez obtenida la eficiencia se procedió a realizar la qPCR de los tratamientos con SAM. El número obtenido en el cálculo de eficiencia fue utilizado en la fórmula para calcular la expresión de cada gen comparando las células tratadas con SAM vs. las no tratadas ($\Delta\Delta Ct$). Se observó una sobreexpresión de las proteínas antioxidantes SOD1, SOD2 y TRX1 a nivel transcripcional en el tratamiento con SAM. La catalasa no presentó cambios significativos a nivel transcripcional (figura 24).

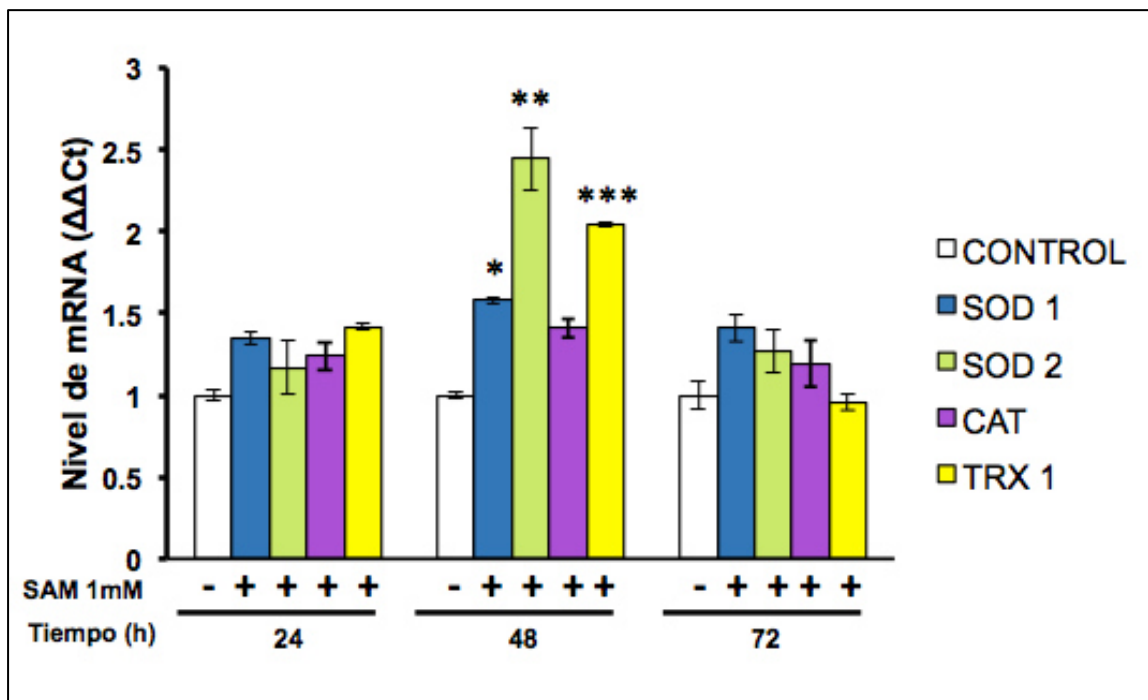


Figura 24. Expresión a nivel transcripcional de proteínas antioxidantes. Cada barra representa el promedio de 3 repeticiones. $p \leq 0.05$ comparación SAM vs. Control para la expresión de SOD1(*), SOD2(**) y TRX1(***)

Para evaluar si estos cambios se presentaban a nivel traduccional, se sembraron células Huh7-VHC replicón, se sometieron a los tratamientos ya

mencionados, y se extrajo la proteína total para cada tiempo a evaluar. Se cuantificó la proteína por el método de Bradford y se siguió con la metodología descrita para western blot. El nivel de SOD1 se vio disminuido en las células tratadas con SAM a la 24 h de tratamiento comparado con el control. La SOD2 presentó una disminución en su expresión que se mantuvo constante durante las 72 h de tratamiento. La CAT no presentó ningún cambio significativo en su expresión y por último, la TRX1 se observó aumentada en el tratamiento combinado a las 48 y 72 h comparado con el control sin tratamiento (figura 25).

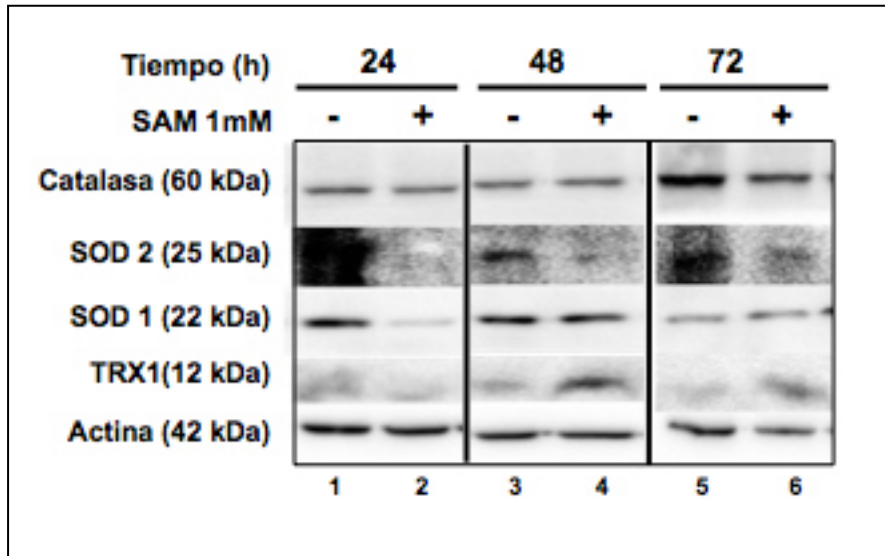


Figura 25. Western blot de las proteínas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT y TRX1. Control de carga: β -actina. Imagen representativa de 3 repeticiones.

5.3 El sistema del proteasoma y sus componentes son regulados en presencia de SAM.

5.3.1 SAM disminuye la actividad catalítica de tipo quimotripsina del proteasoma.

Se midió la actividad del proteasoma utilizando un método de fluorescencia. Se sembraron células Huh7-VHC replicón, se trataron con SAM 1mM, MG132 1 μ M y la combinación de ambos. Se lisaron las células a diferentes tiempos 12, 24, 48 y 72h post-tratamiento. La actividad quimotripsina fue medida usando un sustrato fluorogénico para la actividad catalítica de quimotripsina que reside en la subunidad 20S del proteasoma (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). Se realizó una cinética midiendo la fluorescencia (380 nm excitación, 460 nm emisión) cada 30 min una vez añadido el sustrato. En la figura 26 se resumen los resultados obtenidos para los diferentes tiempos y condiciones. SAM disminuye la actividad de quimotripsina a las 24, 48 y 72 h (10-20%) y al combinar los dos agentes el efecto es mayor comparándolo con el control positivo de inhibición (MG132) alcanzando una inhibición de alrededor de 20-30% mas que el control positivo.

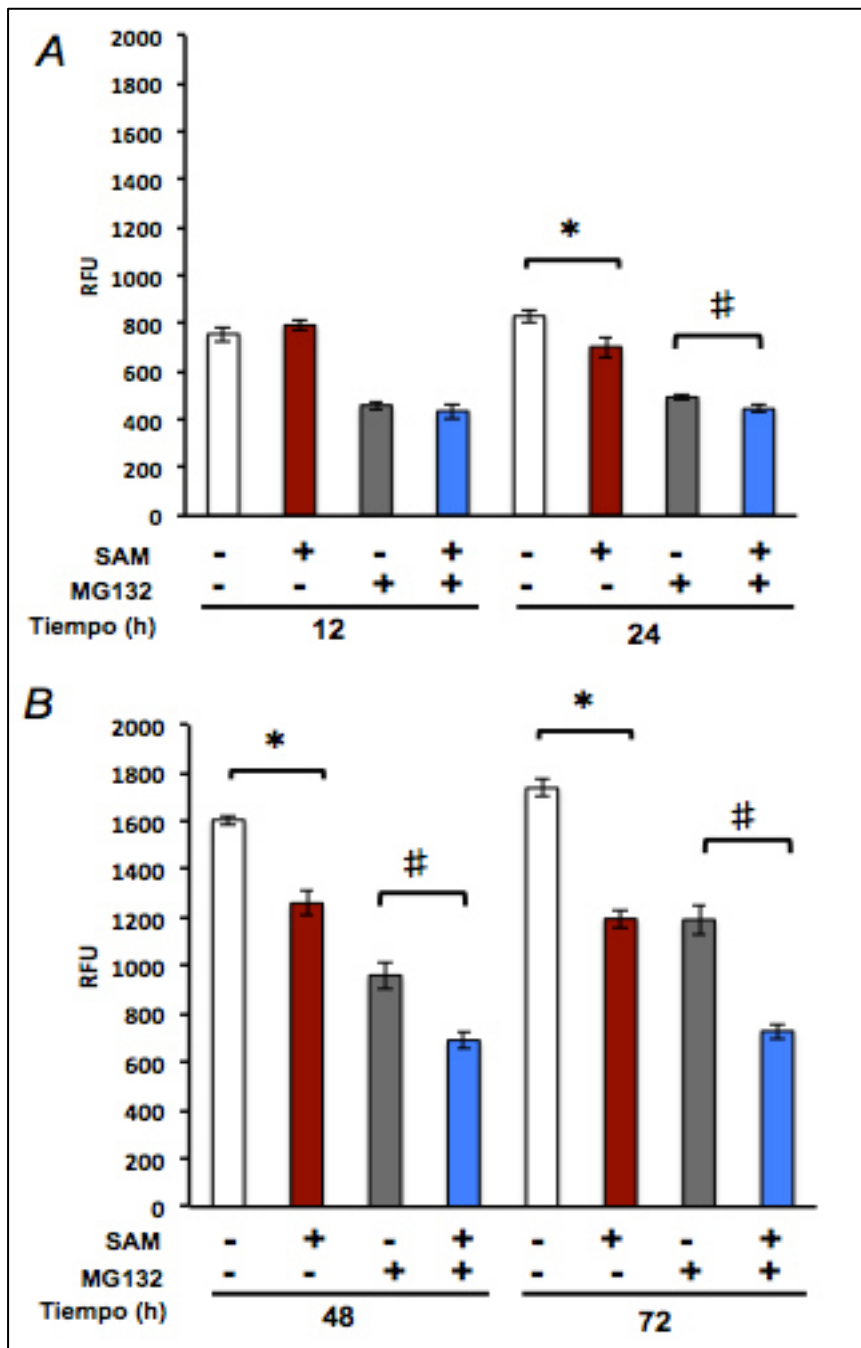


Figura 26. Actividad de tipo quimotripsina del proteasoma. Células Huh7-VHC replicón en presencia de SAM comparadas con los controles sin tratamiento. Se evaluó la fluorescencia directamente proporcional a la actividad del proteasoma a las A. 12 y 24 h y B. 48 y 72 h. Se indica con un signo de - y/o + la adición de los diferentes tratamientos. $p < 0.05$ *Comparado vs. Control, **Comparado vs. MG132.

5.3.2 SAM disminuye la ubiquitinación total en células Huh7-VHC replicón.

Se realizaron western blots para evaluar el nivel de ubiquitinación total en el tratamiento con SAM. Se trataron las células adicionalmente con MG132, al inhibir el proteosoma, hay una acumulación de proteínas ubiquitinadas (figura 27, carriles 5 y 6). Se observó una disminución en la ubiquitinación total de proteínas en la célula en presencia de SAM comparado con los controles sin tratamiento de 24-72 h (figura 28).

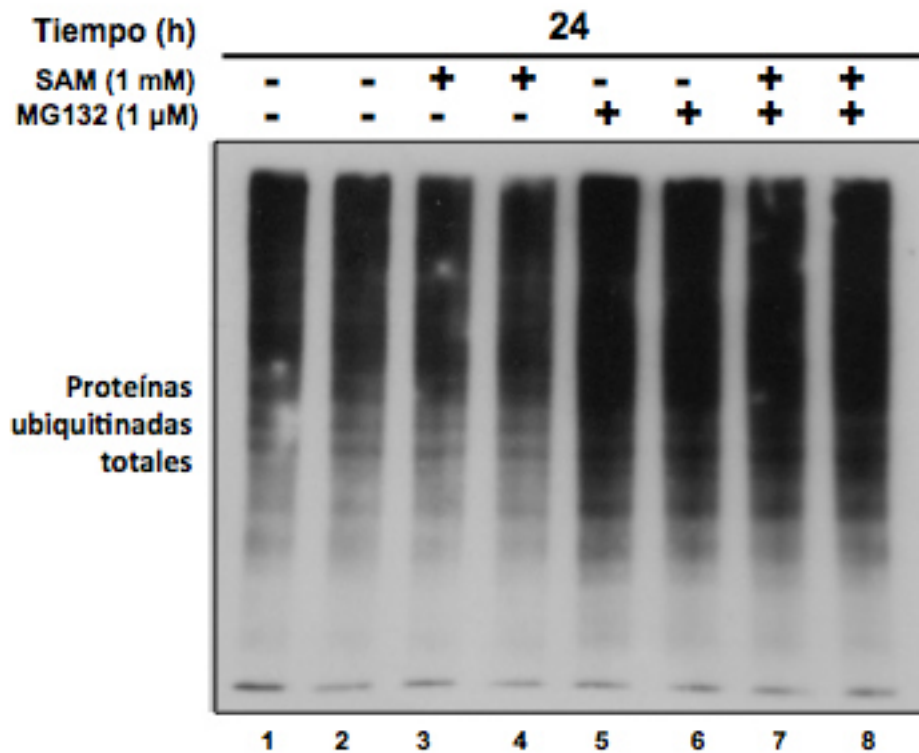


Figura 27. Ubiquitinación total de proteínas en presencia y ausencia de SAM y MG132. Observaciones de las 24 h de tratamiento y en comparación con células Huh7-VHC replicón tratadas con MG132.

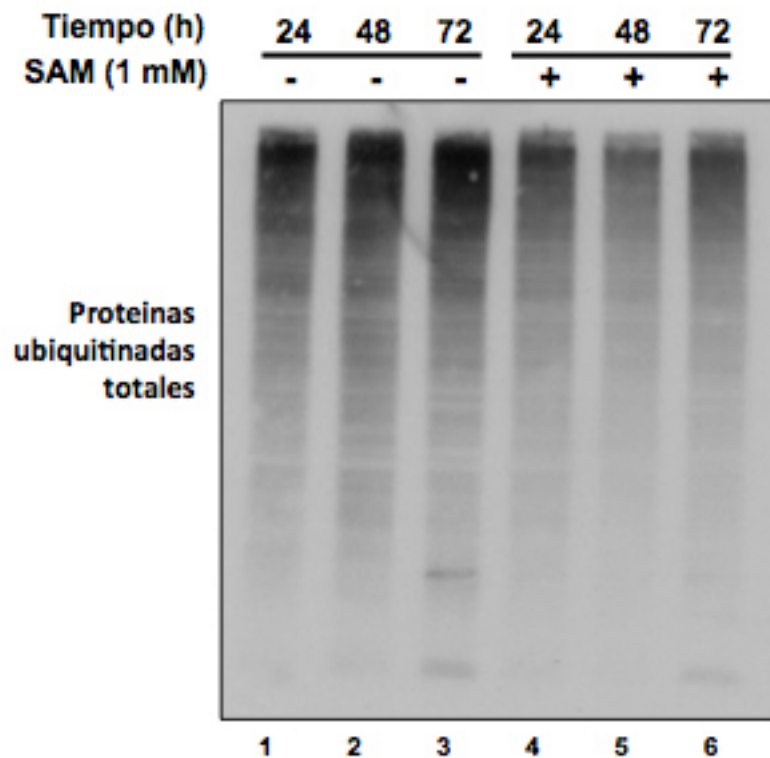


Figura 28. Ubiquitinación total de proteínas en presencia y ausencia de SAM. Observaciones de tratamientos durante 24, 48 y 72 h.

5.3.3 El inhibidor del proteasoma MG132 disminuye la expresión de la proteína NS5A.

Se evaluó la vía del proteasoma en el contexto de replicación viral, para ello se trataron células Huh7-VHC replicón con SAM 1 mM, con MG132 1 μ M y la combinación de ellos. Se realizó un western blot para observar la expresión de la proteína NS5A del virus, encontrando que además de la disminución

observada en el tratamiento con SAM, se observó disminución de la proteína NS5A en el tratamiento con MG132, indicando que el virus necesita de un proteasoma activo para su expresión. La combinación de SAM y MG132 resultó en un efecto aditivo en la disminución de la expresión de NS5A (figura 29).

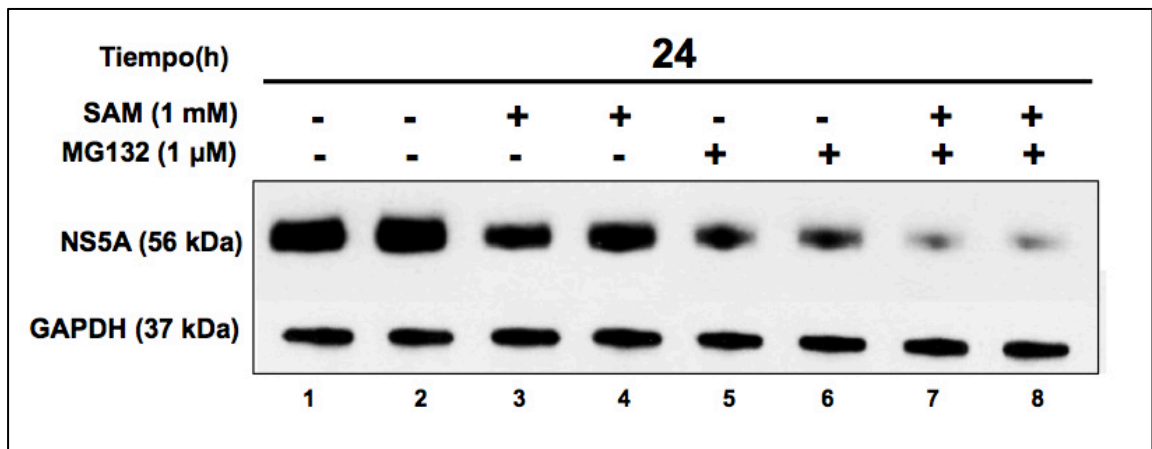


Figura 29. Efecto de SAM y MG132 sobre la expresión de la proteína no estructural NS5A.

5.4 El efecto de SAM sobre el VHC puede estar mediado por metilación.

5.4.1 SAM modifica el perfil de metilación total de proteínas en células Huh7-VHC replicón.

Debido a la importante participación de SAM en las reacciones de metilación en la célula, se evaluó la metilación de proteínas mediante un western blot utilizando un anticuerpo para marcar las dimetil argininas en las proteínas celulares, obteniendo un perfil de metilación en presencia de SAM. Se encontró un perfil diferencial de metilación de proteínas en presencia de SAM, en

comparación con el control sin tratamiento lo que indica una posible participación de esta vía en el efecto de SAM sobre la expresión de VHC (figura 30).

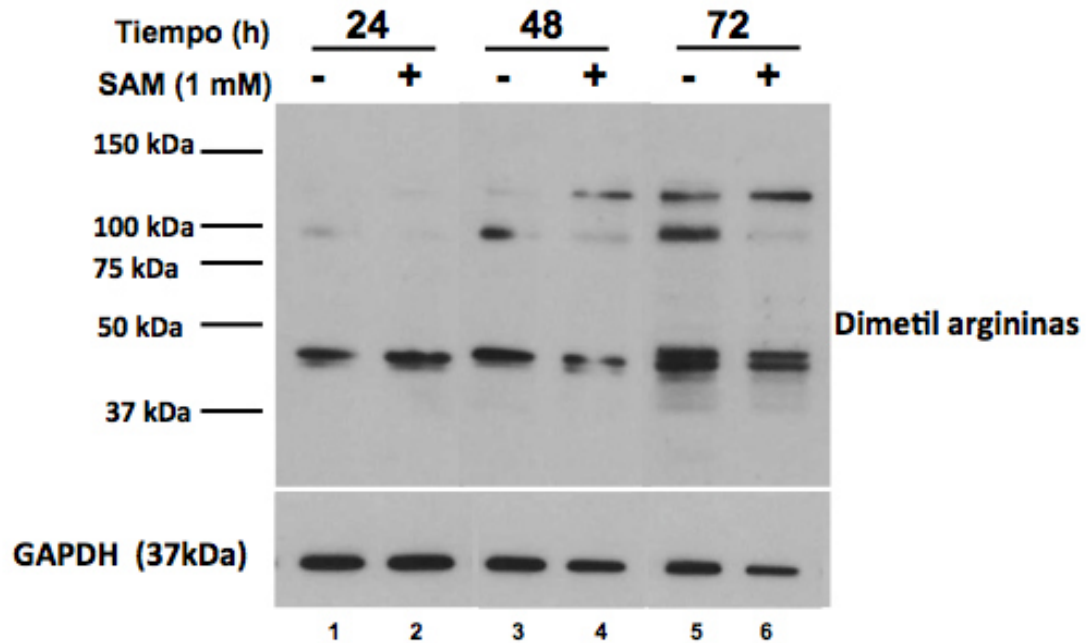


Figura 30. Perfil de metilación global de proteínas en células Huh7-VHC replicón.

5.4.2 La inhibición de la metilación revierte el efecto de SAM sobre el VHC.

Se realizó un experimento utilizando el compuesto 3-deaza adenosina (3-DZA), un inhibidor de las reacciones de transmetilación en células somáticas. El efecto se evaluó por western blot. Se encontró que la inhibición de la metilación, revierte parcialmente el efecto de SAM en la expresión de NS5A, con esto se

confirma que la metilación es un proceso importante en el mecanismo de acción de SAM (figura 31).

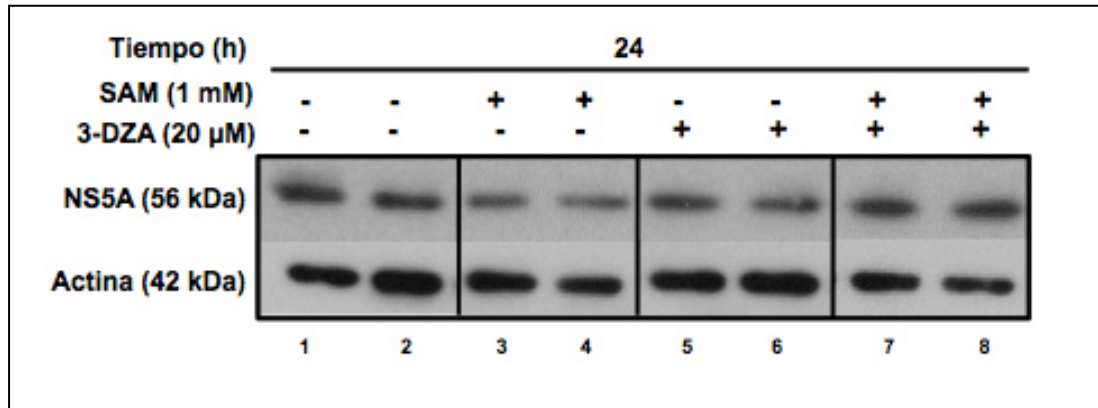


Figura 31. Efecto de la inhibición de las reacciones de transmetilación en la expresión de NS5A.

5.5 El efecto de SAM no está mediado por regulación en la estabilidad del RNA del VHC.

SAM es una molécula pleiotrópica que está involucrada en múltiples reacciones en la célula, participando directamente en las siguientes vías: transmetilación, trans-sulfuración y amino-propilación. Con base en eso, se investigó si SAM es capaz de alterar la estabilidad del RNA del VHC. Para ello se sembraron células Huh7-VHC replicón, las cuales fueron incubadas con SAM 1mM, y un grupo de ellas fueron tratadas adicionalmente con act D 4 µg/ml o CHX 50µg/ml por 2 h previas al tratamiento de SAM. Las células se cosecharon 16 h post-tratamiento y se extrajo el RNA. El RNA-VHC fue cuantificado por qPCR.

De acuerdo a lo observado, podemos sugerir que la disminución del RNA del VHC mediada por SAM es debida a un mecanismo independiente de alteraciones en su vida media y/o reducción de la estabilidad de su RNA. Sin embargo, SAM necesita el proceso de traducción celular para disminuir la expresión de las proteínas virales (figura 32).

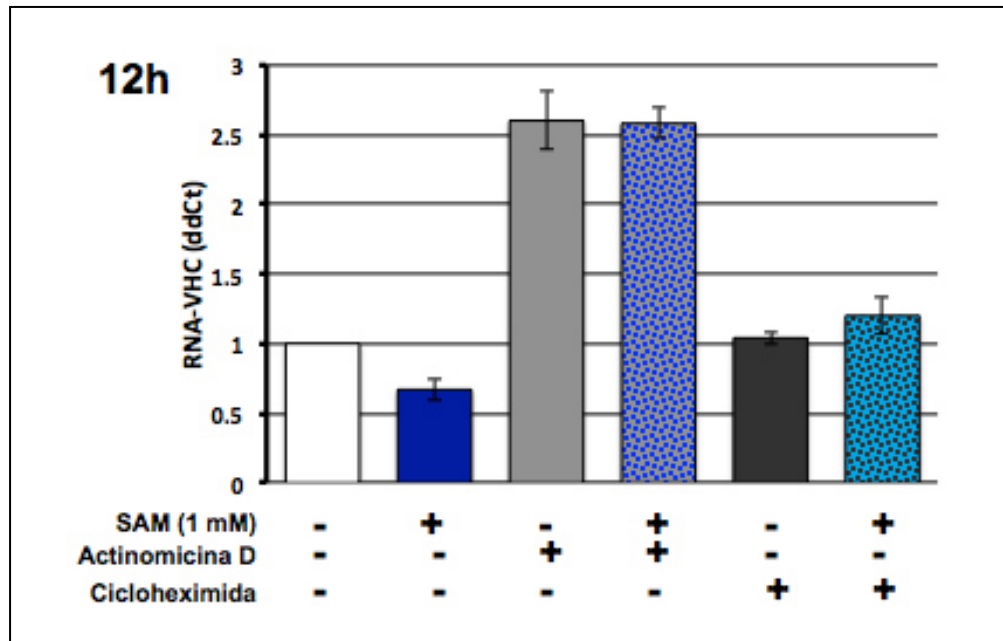


Figura 32. Efecto de la inhibición de la transcripción y traducción en la expresión del RNA-VHC. Evaluado por qPCR.

Mediante western blot se evaluó también el efecto de la inhibición de la traducción celular en presencia de SAM y se encontró que la inhibición de la traducción celular disminuye el efecto de SAM sobre el VHC, es decir, es dependiente de alguna proteína o proteínas de la célula para ejercer su efecto (figura 33).

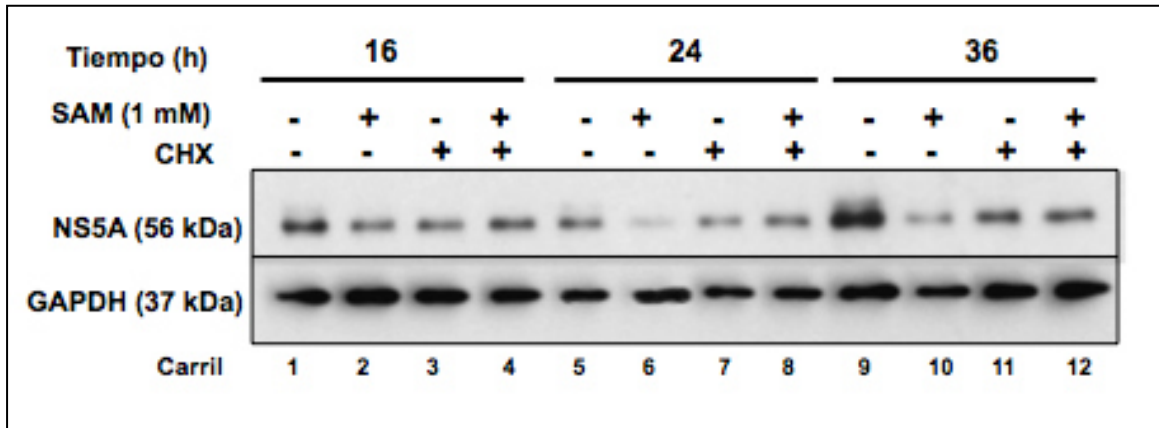


Figura 33. Efecto de la inhibición de la traducción de proteínas celulares en la expresión de NS5A. Evaluado por western blot.

5.6 SAM promueve la expresión de la enzima MAT1A, responsable de su biosíntesis.

5.6.1 La expresión de MAT1A se encuentra sobre-regulada en presencia de SAM en células Huh7-VHC replicón.

MAT1A es la enzima participante en la síntesis de SAM y la produce con mayor eficiencia que MAT2A. La primera es una enzima que se expresa en hígado adulto sano y la segunda se ha encontrado en hígado fetal, tejido extrahepático y cáncer hepático. Para cuantificar el mRNA de estas dos enzimas, se construyeron curvas de eficiencia para determinar la eficiencia de la reacción utilizando primers específicos para cada gen (figuras 34 y 35). En nuestro modelo se encontró que al administrar SAM, la expresión MAT1A se

reguló positivamente; de igual manera se observó la expresión de MAT2A sobre-regulada en presencia de SAM (figura 36).

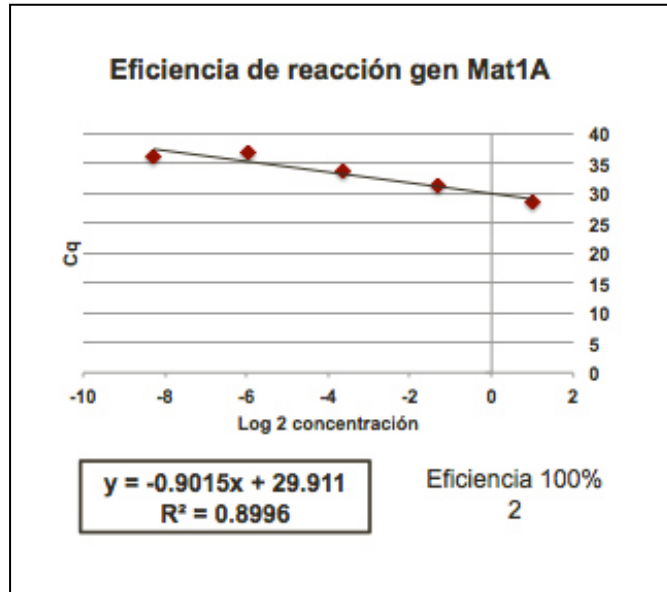


Figura 34. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para Mat1a.

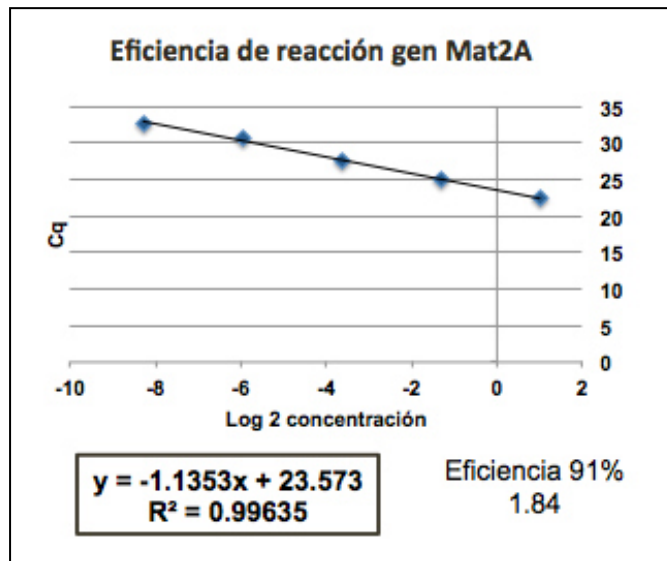


Figura 35. Curva de eficiencia para la reacción de qPCR para Mat2a.

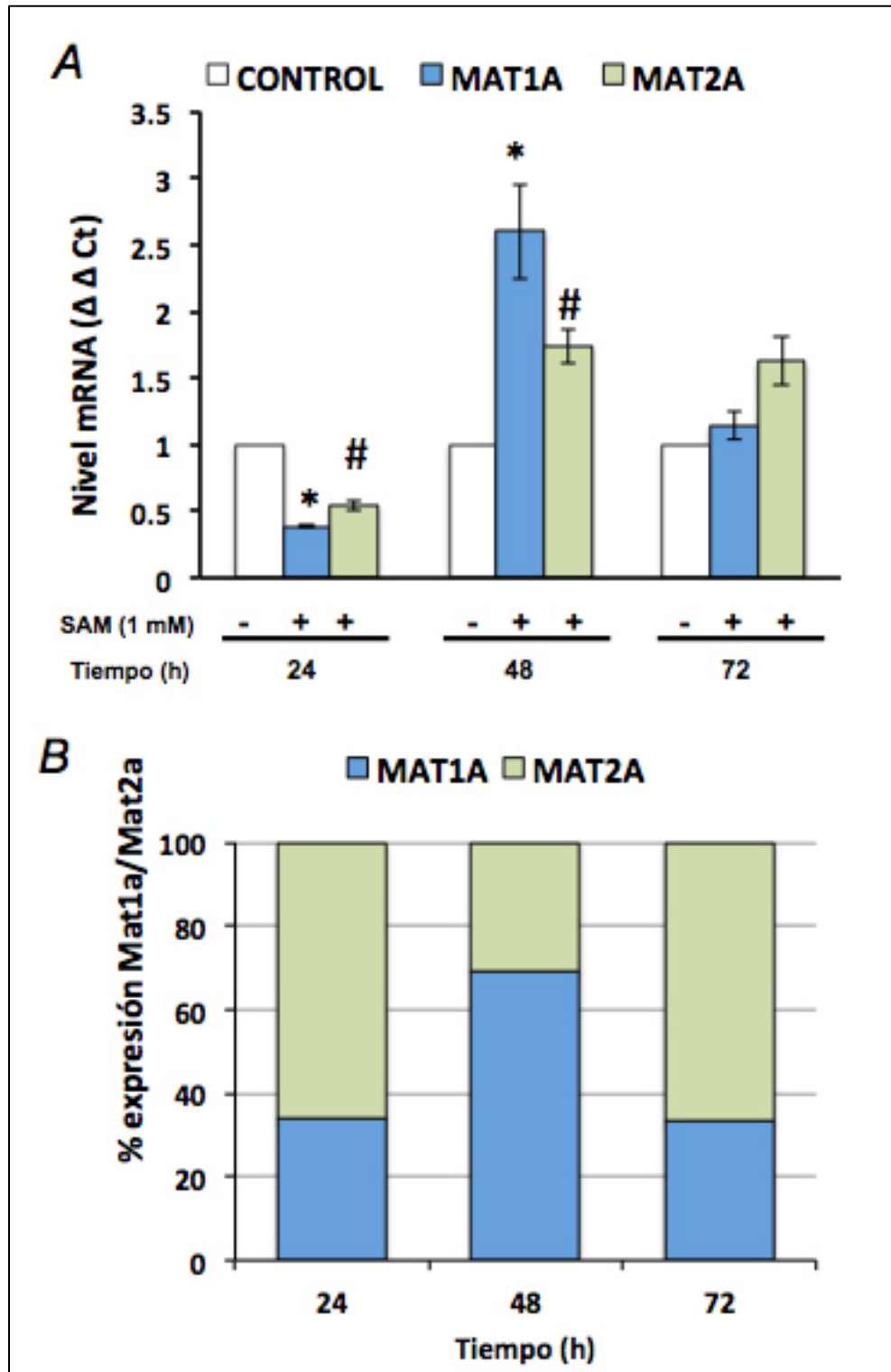


Figura 36. Expresión del mRNA de Mat1a y Mat2a en presencia y ausencia de SAM. A. Panel de expresión a nivel transcripcional de MAT1 y MAT2 mediante la técnica de qPCR y, B. Relación de la expresión de MAT1A vs MAT2A. T student, Control vs. SAM $*=p<0.01$, Control vs. SAM $\#=p<0.01$.

MAT1 y MAT2 también fueron evaluadas a nivel proteína mediante la técnica de western blot. En el caso de MAT1 se observó un aumento en la señal de esta proteína en los tratamientos con SAM. En el caso de MAT2 se observó una regulación negativa en el tratamiento con SAM, demostrando un recambio en la expresión de estas dos proteínas (figura 37).

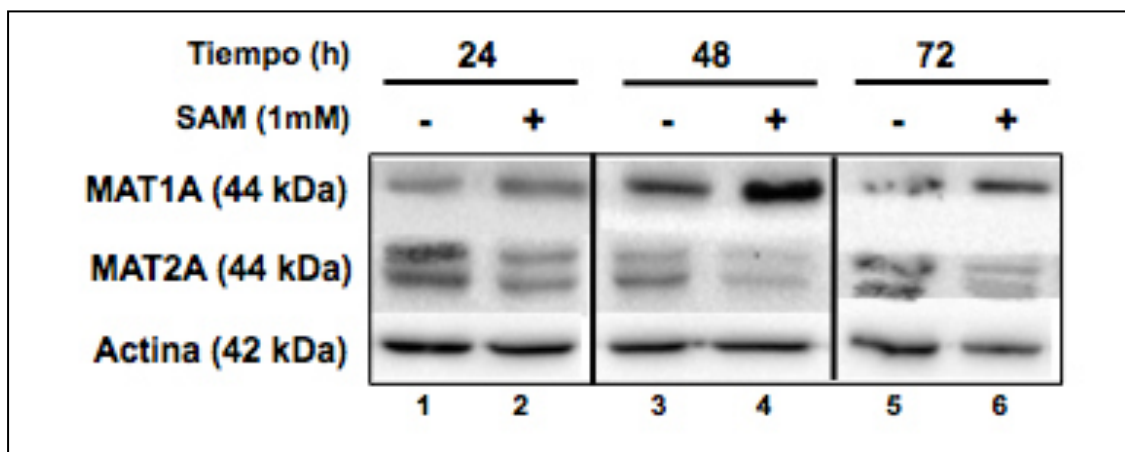


Figura 37. Expresión de MAT1A y MAT2A a nivel traduccional en células Huh7-VHC replicón por western blot.

5.6.2 La administración exógena de SAM estimula su propia biosíntesis endógena en células Huh7-VHC replicón.

Debido al efecto a largo plazo observado en la disminución de la expresión del VHC (hasta las 72 h al menos), se cuantificaron los niveles de SAM intracelular por UPLC. Se encontró que los niveles de SAM se mantienen altos o constantes (48h) en comparación con las células no tratadas con SAM (figura 38). Esto explica el efecto a largo plazo observado en nuestro modelo celular.

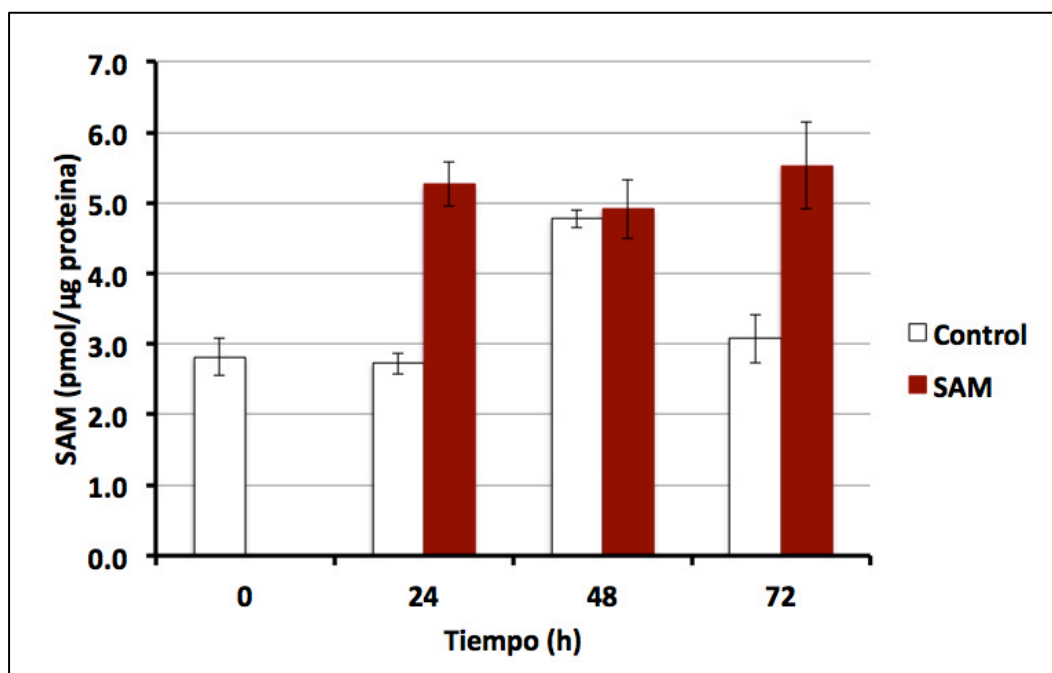


Figura 38. Cuantificación de SAM intracelular por UPLC.

5.7 SAM estimula la vía de respuesta antiviral de IFN tipo 2 y no la de IFN tipo 1.

Feld y colaboradores sugirieron que SAM es capaz de sensibilizar la vía de señalización por IFN, en este trabajo evaluamos la vía de respuesta a IFN mediante la medición de la expresión a nivel traduccional de STAT1 y PKR, proteínas que son sobre-expresadas en un ambiente donde la célula es estimulada por IFN ya sea por una infección o administración del mismo. Nuestros resultados mostraron que en presencia de SAM, no existen cambios significativos en cuanto a la expresión de estas dos proteínas, sin embargo, en presencia de PEG-IFN y RBV (usado como control positivo de inducción de respuesta antiviral) y del tratamiento combinado de SAM+PEG-IFN+RBV, se observa una señal mayor con respecto al control. Sugiriendo que SAM no

estimula la respuesta antiviral mediada por STAT1 y PKR de manera independiente (figura 39).

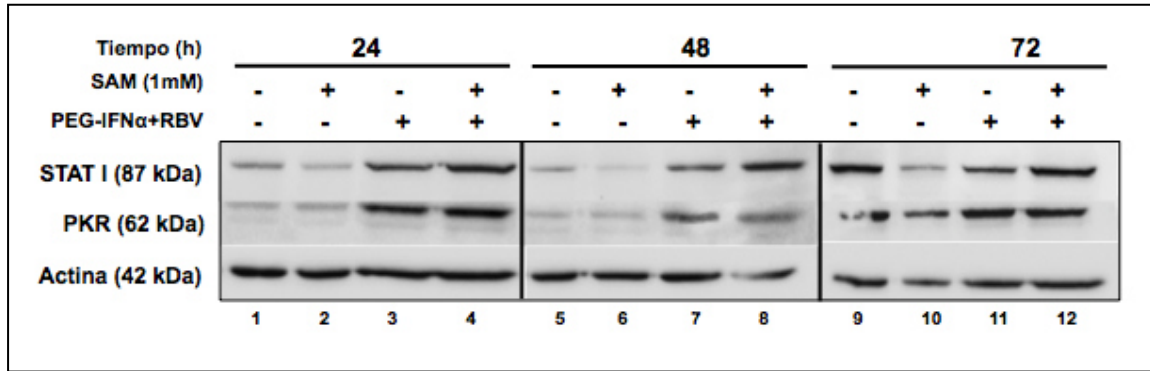


Figura 39. Expresión a nivel traduccional de las proteínas STAT1 y PKR.

Se evaluó por ultimo la respuesta de IFN y a nivel transcripcional y de esta manera conocer la respuesta de IFN de tipo II inducida por SAM. Para ello se sembraron células Huh7-VHC replicón, se extrajo el RNA total a las 12 h de tratamiento con SAM y se evaluó la expresión del gen que codifica para IFN y utilizando primers dirigidos contra una región específica del gen y normalizando con GAPDH por el método $\Delta\Delta Ct$. La expresión a nivel transcripcional aumentó 2.5 veces a las 12 h de tratamiento con SAM comparado con el control sin tratamiento (figura 40).

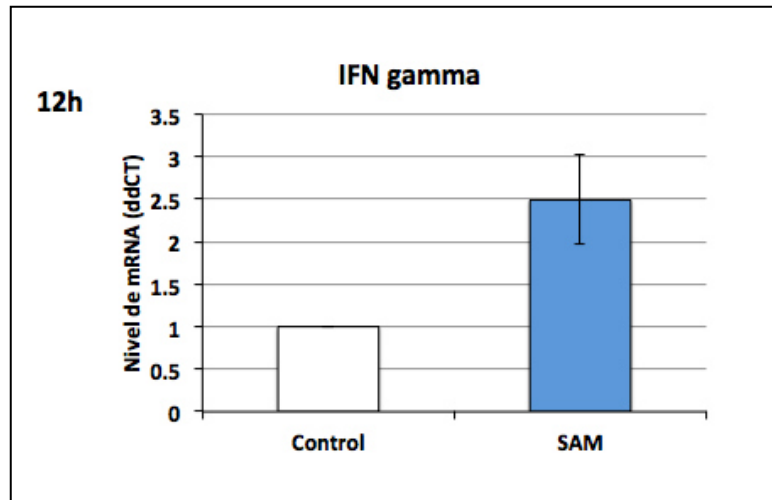


Figura 40. Expresión a nivel transcripcional de IFN γ .

VI. DISCUSIÓN

La terapia contra hepatitis C ha sufrido cambios radicales durante los últimos cuatro años; los pacientes ahora tiene opciones más efectivas, tomando en cuenta los DAAs disponibles en el mercado y gracias a las diferentes combinaciones (inhibidores de NS5A, NS5B y NS3/4A)^{6,58,60}, se comienza a considerar a la hepatitis C como una enfermedad curable.

En 2011, reflejando la búsqueda de alternativas al tratamiento de PEG-IFN y RBV, se demostró la actividad antiviral de SAM, frente a la infección *in vivo* e *in vitro* de VHC, en un esquema combinado con PEG-IFN y RBV, en ese entonces el tratamiento estándar. Feld y colaboradores aportaron información acerca del posible mecanismo de acción de SAM. En dicho estudio sugirieron que SAM es capaz de potenciar el efecto antiviral de PEG-IFN, basándose en que SAM puede estar relacionado a una respuesta viral temprana⁸². En el presente trabajo, demostramos que SAM regula la expresión del VHC por si solo (sin la participación de PEG-IFN y RBV), en una línea celular de hepatoma que expresa las proteínas no estructurales del virus⁹⁹. Nuestros resultados

concuerdan parcialmente con los de Feld y colaboradores, ya que demostramos que SAM posee una acción antiviral contra el VHC sin ayuda de PEG-IFN y RBV. En el reporte de Feld, el efecto *in vitro* de la adición de SAM fue significativo a partir de las 72 h, en terapia combinada con PEG-IFN, mientras que en nuestros experimentos encontramos una disminución de la expresión del VHC (RNA y NS5A) desde las 24 h de tratamiento. La discrepancia observada puede ser debida a la diferencia en las dosis utilizadas en ambos trabajos, la dosis máxima utilizada por Feld y colaboradores fue de 1.6 nM, en este trabajo la dosis más alta usada fue de 1mM, sin comprometer la viabilidad de las células⁹⁹. Además encontramos que SAM posee un efecto antiviral sinérgico cuando se añade PEG-IFN y RBV al tratamiento de las células VHC-replicón.

Con nuestros resultados demostramos que SAM disminuye la expresión de VHC en dos niveles; a nivel RNA y a nivel proteína, en este caso la proteína NS5A, con la cual se confirmó la disminución de la expresión del VHC por acción de SAM. Partiendo de eso, se exploró si SAM desencadena desestabilización o modulación de los niveles basales del RNA viral, con la finalidad de saber si el efecto antiviral de SAM se debía a una interacción con el RNA viral. Según los resultados, podemos sugerir que la disminución del RNA-VHC mediada por SAM es debida a un mecanismo independiente de alteraciones en la vida media o estabilidad del RNA viral. Sin embargo, se demostró que SAM requiere de la traducción normal en la célula para llevar a cabo su función. Esto nos conduce a la modulación de la expresión de NS5A por SAM, NS5A es una fosfoproteína no estructural del virus que puede

encontrarse en múltiples estados de fosforilación, posiblemente debido a esto, resulta tener múltiples funciones en el ciclo viral de VHC, se sabe que no tiene actividad enzimática en la replicación viral, pero que puede servir de co-factor en la replicación junto con NS5B¹⁰⁰. De hecho, algunos de los nuevos DAAs tienen como blanco NS5A, por mencionar algunos; dalcatasvir, ledipasvir, ombitasvir y elbasvir. Daclatasvir es un antiviral recomendado para tratamiento de genotipo 3, con RVS cercanas al 100% en pacientes no cirróticos. Una de las desventajas de este antiviral es que en pacientes infectados con genotipo 3 y que presentan cirrosis, la RVS cae a un 50-60%⁵⁸. Elbasvir es otro de los antivirales inhibidores de NS5A, posee actividad contra los genotipos 1a, 1b, 2a, 3a y 4a, pero tiene baja potencia contra genotipo 2b¹⁰¹. Ombitasvir es uno de los DAAs contra NS5A mas potentes, y tiene actividad contra todos los genotipos, es decir, es un compuesto con actividad antiviral pangénotípica. El punto débil de todos estos antivirales dirigidos contra NS5A, es la baja barrera de resistencia; se ha encontrado que a los dos días de iniciada la terapia con ombitasvir, aparecen las mutantes resistentes, en los codones 28, 30 y 93 de la proteína NS5A¹⁰². Algunas de las variantes asociadas a resistencia (RAVs) generadas en NS5A son Y93H, Q30E/K/R, L31I/M¹⁰³ Por tal motivo se busca que las terapias incluyan antivirales con diferente mecanismo de acción. En tales casos, de desarrollo de resistencia y falla en el tratamiento de pacientes con cirrosis, SAM podría ser una alternativa, al potenciar la inhibición de la replicación viral; con mínimos efectos adversos, otra de las ventajas de utilizar SAM. El paso a seguir, sería probar la actividad antiviral de SAM frente a otros genotipos, ya que el utilizado en este trabajo corresponde al genotipo 1b.

SAM es una molécula pleiotrópica involucrada en múltiples reacciones celulares, participando directamente en las reacciones de transmetilación, trans-sulfuración y aminopropilación. Además esta involucrada en muchas otras reacciones participando como metabolito clave regulando el crecimiento del hepatocito, la muerte y diferenciación.

El objetivo principal de este trabajo fue investigar el o los mecanismos de acción de SAM sobre la replicación del VHC. Para ellos nos enfocamos en cuatro principales vías, como antioxidante, como estimulante de la vía de IFN, como modulador del proteasoma y como agente donador de metilos. Debido a que SAM es el principal precursor de la síntesis de GSH, para determinar si SAM actuaba como antioxidante o modulador del estrés oxidativo se investigó las vías de síntesis de GSH, generación de ROS y expresión de proteínas antioxidantes. Se examinó el nivel de RNA de enzimas antioxidantes y la relación glutatión reducido/oxidado. Previamente, nuestro grupo de investigación reportó que la actividad de las enzimas SOD-1, CAT y Gpx, se encontró inducida en células VHC-replicón mientras que en células parentales fue muy baja¹⁰⁴. En nuestro trabajo encontramos que SAM estimula la expresión del mRNA de SOD1, SOD2 y TRX1 e induce la síntesis de glutatión, sin embargo, el aumento de la síntesis de GSH no tuvo efecto en la generación de ROS en ninguno de los dos niveles evaluados, citosol y mitocondria, de las células que expresan las proteínas virales. De manera interesante, encontramos que a nivel traduccional las proteínas antioxidantes mostraban una disminución de la expresión, en lugar de una estimulación, como se observó a nivel transcripcional. Un hecho importante con respecto a la SOD2 es

que en los casos de pacientes infectados con VHC se observa una mayor expresión de esta enzima, como reflejo posiblemente del estrés oxidativo mitocondrial, causado por VHC; en nuestro trabajo observamos que esta enzima regresó a niveles basales, incluso a los observados en células Huh7 parental. No obstante, este hallazgo pudiera ser solo un reflejo de la disminución de la expresión del VHC y no un efecto de SAM directamente. El hecho de que SAM no disminuyera las ROS en nuestro modelo de replicón puede ser debido a que este modelo se encuentra adaptado al estrés oxidativo generado por la expresión del replicón de manera constitutiva.

En nuestro estudio la adición de SAM al tratamiento de PEG-IFN y RBV no estimuló la expresión de ISGs evaluados en este trabajo (PKR y STAT1). Observamos que la expresión de PKR y STAT1 fue estimulada en el tratamiento con PEG-IFN (usado como control positivo de estimulación de ISGs), pero no en las células tratadas con SAM, sugiriendo que la regulación negativa del VHC por SAM es independiente de la vía de IFN α ⁹⁹. Por otro lado, se encontró que SAM estimula la expresión a nivel transcripcional de IFN γ ; es bien sabido que IFN γ tiene un efecto antiviral contra el VHC¹⁰⁵. Este hallazgo podría explicar parcialmente el efecto de SAM sobre el VHC, sin embargo, es importante resaltar que se debe confirmar que la proteína de IFN γ está presente, mediante ELISA o western blot. Se sabe que los IFN tipo I y II pueden regular la expresión de los genes estimulados por IFN (ISGs) de manera STAT1 y PKR-independiente, mediante un mecanismo de señalización alternativo que requiere el receptor de IFN γ y la cinasa JAK 1^{95,96}, de tal manera que puede

ser posible que el mecanismo por el cual SAM regula la expresión de IFN y sea STAT1 y PKR independiente.

El ciclo viral del VHC se encuentra regulado por proteínas virales y celulares, y se ha demostrado ampliamente que la estabilidad de las proteínas virales es regulada por el proteasoma^{106,107} y que VHC desencadena la degradación de factores del huésped¹⁰⁸. Por otro lado, se sabe que SAM es capaz de regular la actividad del proteasoma¹⁰⁹, por tal motivo en este trabajo se exploró la participación del proteasoma en el mecanismo de SAM contra el VHC. Nuestros resultados muestran que SAM es capaz de disminuir la actividad del proteasoma de manera tiempo dependiente y además que esta disminución se mantiene a lo largo del tiempo, aun y cuando solo se usó una sola administración de SAM, utilizando un inhibidor del proteasoma, MG132, se observó un efecto similar en los tiempos largos de tratamiento. Se evaluó adicionalmente el efecto que tiene el inhibidor del proteasoma sobre la expresión de la proteína viral NS5A; se observó que la administración de MG132 inhibe la expresión de NS5A y que la combinación de SAM y MG132 posee un efecto negativo aditivo sobre la expresión de NS5A, todo esto sugiere que el sistema de proteasoma juega un papel importante en el mecanismo de acción de SAM. Adicionalmente, se encontró que SAM es capaz de modular la ubiquitinación de las proteínas (celulares o virales), este hallazgo es importante, debido a que las modificaciones postraduccionales en las células comparten familias de enzimas y proteínas que participan en el proceso. Éste representa un campo que puede explorarse, ya que existen reportes en donde SAM muestra tener acción sobre la sumoilación¹⁰⁹ y se ha sugerido que la proteína

NS5A es capaz de sumoilarse y de esta manera llevar a cabo su función como co-factor de NS5B¹⁰⁰.

Está bien demostrado que SAM es el principal donador de grupos metilo en las reacciones de transmetilación. Feld y colaboradores sugirieron que SAM participa de manera importante en la metilación de STAT1, factor de transcripción que al ser fosforilado se activa formando dímeros, se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes estimulados por IFN¹¹⁰. La metilación de STAT1 evita la unión de su inhibidor PIAS1, permitiéndole de esta manera estar disponible para la translocación⁸². En este trabajo no exploramos la metilación de STAT1 específicamente, en su lugar inhibimos la metilación total, a nivel DNA y proteínas, y observamos que el efecto de SAM sobre la expresión del virus fue revertido, lo cual sugiere una participación importante de la metilación en el efecto de SAM sobre el VHC.

El mecanismo molecular de la patogénesis del VHC permanece desconocido, pero se sabe hasta ahora que factores virales y del huésped contribuyen para que se desarrolle la enfermedad. MAT es una enzima esencial que cataliza la formación de SAM. En mamíferos, dos genes codifican para la subunidad catalítica de MAT (MAT1A y MAT2A) los cuales se expresan de diferente manera según el tejido. *Mat1a* codifica para la subunidad $\alpha 1$ que forma un dímero (MAT3) y un tetrámero (MAT1A) que están predominantemente expresados en el parénquima hepático; mientras que *Mat2a* codifica para la subunidad catalítica $\alpha 2$ de la isoenzima⁷⁰. MAT2A, que se expresa en todos los demás tejidos. En pacientes con daño hepático crónico hay una disminución de la biosíntesis de SAM exacerbando el daño hepático, y entonces el suplemento

podría representar una terapia útil. En este trabajo se encontró que SAM induce un recambio en la expresión de las proteínas MAT2A y MAT1A, y que además este recambio estimula la biosíntesis de SAM intracelular lo que promueve un efecto duradero (hasta las 72h) a pesar de la vida media corta de SAM y de que solo se utilizó una sola dosis de SAM en los ensayos de este trabajo. Existen algunos reportes acerca de la participación de MAT1A en cáncer hepático y algunos factores relacionados, como DDX3X, una RNA helicasa de tipo “Dead box” relacionada con la traducción de proteínas mediante la interacción con factores de iniciación eIF4e, eIF4a, eIF2alfa, etc¹¹¹. Además de que en el núcleo ha sido asociada con el corte y empalme, y el transporte de proteínas virales al citosol; se ha propuesto a DDX3X como una proteína diana de SAM¹¹². Debido a su capacidad de activar las caspasas 6 y 9, se ha propuesto como un factor proapoptótico en CHC derivado de VHC¹¹³.

Los resultados encontrados en este estudio sugieren que un posible mecanismo por el cual SAM disminuye la expresión del VHC, podría involucrar un efecto aditivo entre la modulación de la expresión de enzimas antioxidantes, restauración de los niveles de glutatión, y el recambio de la expresión de MAT2A/MAT1A, metilación de proteínas y/o DNA y la regulación de la actividad del proteasoma y del proceso de ubiquitinación.

VII. CONCLUSIONES

1. Se definió la concentración de 2.5 mM o menor de SAM, como la dosis segura no tóxica para las células Huh-7 replicón durante las 72 h de tratamiento.
2. SAM inhibe la replicación del VHC a nivel transcripcional y el efecto es dosis y tiempo dependiente. Se definió la dosis de 1mM como efectiva para la disminución de la expresión del VHC.
3. SAM disminuye un 50-60% la expresión del VHC a nivel transcripcional y traduccional durante 24-72 h de tratamiento en una línea celular de hepatoma que expresa las proteínas no estructurales del virus.
4. El efecto de SAM se potencia cuando se adiciona PEG-IFN y RBV, disminuyendo hasta un 90% de la replicación del virus.
5. El efecto de SAM sobre la expresión del virus no está mediado por modulación en ROS en citoplasma y mitocondria, ya que al exponer a las células al tratamiento con SAM, estas no muestran disminución o cambios significativos en la producción de peróxidos intracelulares o en la generación de anión superóxido en mitocondria..
6. SAM es capaz de modular negativamente la actividad de quimotripsina del proteasoma y disminuir la ubiquitinación de proteínas totales. La

disminución en la actividad de tipo quimotripsina disminuye la degradación de ciertas proteínas celulares, las cuales podrían estar participando en la actividad antiviral. El efecto se potenció al combinar un inhibidor del proteasoma (MG132) con SAM, obteniendo un efecto mayor que el observado para cada compuesto en monoterapia. La disminución del nivel de ubiquitinación total se vio revertido al combinar SAM y MG132.

7. La metilación participa parcialmente en el efecto de SAM sobre la expresión del VHC, ya que al inhibir las reacciones de transmetilación, se recupera el nivel de expresión del virus.

8. De acuerdo con los ensayos de act D y CHX, SAM no altera la estabilidad del RNA viral y necesita de factores celulares para ejercer su efecto, según los resultados obtenidos en los ensayos de act D y CHX.

9. SAM induce un recambio en la expresión de MAT1A/MAT2A favoreciendo la síntesis de novo de SAM en la célula, lo cual se relaciona con el efecto a largo plazo.

10. El tratamiento con SAM incrementa el nivel IFN y a nivel transcripcional, pero no modifica la expresión a nivel traduccional de PKR y STAT1, los cuales participan en la vía de respuesta antiviral de IFN tipo 1.

Aportación de este trabajo

Se identificó un nuevo mecanismo de acción de SAM que involucra la disminución de la actividad de quimotripsina y disminución de la ubiquitinación, esto es algo que no se había descrito antes en el contexto de infección con el VHC. Esto da pie a nuevos enfoques para investigar la vía de degradación de proteínas por proteasoma, en donde se pueden encontrar blancos terapéuticos que puedan servir como potenciadores en la terapia actual.

Un descubrimiento importante fue que el mecanismo por el cual SAM disminuye la replicación del VHC no involucra una acción como antioxidante.

Otro hallazgo importante fue el recambio de la expresión de MAT2A por MAT1A en presencia de SAM en el contexto de la infección por el VHC, esto identifica a este par de proteínas como posibles actores importantes en la replicación del VHC.

Y por último, se demostró que la metilación de proteínas juega un papel importante en el efecto de SAM sobre la replicación del VHC, estos hallazgos abren nuevos caminos para investigar la metilación específica de proteínas virales o proteínas celulares que estén involucradas en el establecimiento de la infección por VHC.

VIII. PERSPECTIVAS

- Medir ubiquitinación de proteínas virales mediante inmunoprecipitación.
- Explorar la vía de sumoilación de NS5A.
- Medir los niveles de componentes del inmunoproteasoma (MECL1, LMP2, LMP7) que son estimulados por IFN y en presencia de SAM.

XI. REFERENCIAS

1. WHO. Hepatitis C Fact sheet N°164 [Internet]. Updated July 2015. 2015 [cited 2015 Aug 20]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
2. WHO/CDS/CSR/LYO/2003. Hepatitis C. 2003.
3. Colvin HM, Mitchell AE. Hepatitis and Liver Cancer. A National Strategy for Prevention and control of Hepatitis B and C. 2010.
4. Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011 Mar 31;364(13):1195–206.
5. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2011 Jun 23;364(25):2405–16.
6. FDA. FDA approves Sovaldi for chronic hepatitis C [Internet]. 2013. Available from: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm377888.htm>
7. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2015. *J Hepatol* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2015;61(2):373–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.025>
8. Valdespino JL, Conde-González CJ, Olaiz-Fernández G, Palma O, Kershenovich D, Sepúlveda J. Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿Un problema de salud pública emergente? *Salud Publica Mex*. 2007;49(SUPPL. 3):395–403.
9. Hassan M, Selimovic D, El-Khattouti A, Soell M, Ghozlan H, Haikel Y, et al. Hepatitis C virus-mediated angiogenesis: Molecular mechanisms and therapeutic strategies. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(42):15467–75. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i42/15467.htm>
10. Perz JF, Armstrong GL, Farrington L, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006

Oct;45(4):529–38.

11. WHO. Viral hepatitis. Sixty-third World Health Assembly [Internet]. 2010. Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_R18-en.pdf
12. Szabo S, Bibby M, Yuan Y, Donato B, Jiménez-Mendez, R Castañeda-Hernández G, Rodríguez-Torres M, et al. The epidemiologic burden of hepatitis C virus infection in Latin America. *Ann Hepatol*. 2012;11(5):623–35.
13. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(9):558–67.
14. El-Serag H. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264–1273.
15. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2014;61(1):77–87.
16. Burguete-García AI, Conde-González CJ, Jiménez-Méndez R, Juárez-Díaz Y, Meda-Monzón E, Torres-Poveda K, et al. Hepatitis C seroprevalence and correlation between viral load and viral genotype among primary care clients in Mexico. *Salud Publica Mex*. 2011;53(SUPPL. 1):7–12.
17. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Nature Publishing Group; 2013;10(9):553–62.
18. Méndez-Sánchez N, Aguilar-Ramírez JR, Reyes A, Dehesa M, Juárez A, Castañeda B, et al. Etiology of liver cirrhosis in Mexico. *Ann Hepatol*. 2004;3(1):30–3.
19. Sporea I, Popescu A, Sirli R. Why, who and how should perform liver biopsy in chronic liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2008;14(21):3396–402.
20. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997;349(9055):825–32.
21. Kamath P, Wiesner R, Malinchoc M, Kremers W, Therneau T, Kosberg C, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001;33(2):464–70.
22. Pawlotsky J-M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004;12(2):96–102.

23. Kershenobich D, Razavi HA, Sánchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int.* 2011;31(SUPPL. 2):18–29.
24. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* (80-). 1989 Apr 21;244(4902):359–62.
25. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol.* 2011;75(24):12047–57.
26. Luo G, Xin S, Cai Z. Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol.* 2003;77(5):3312–8.
27. Tellinghuisen TL, Evans MJ, von Hahn T, You S, Rice CM. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. *J Virol* [Internet]. 2007 Sep [cited 2014 Feb 9];81(17):8853–67. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1951464&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 2005;436(7053):933–8.
29. Moradpour D, Penin F, Rice C. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(6):453–63.
30. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne, Donna M. . Syder AJ, Panis M, Wölk B, Hatzioannou, Theodora McKeating JA, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature.* 2007;446:801–5.
31. Bartosch B, Cosset F. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology.* 2006;348(1):1–12.
32. Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol.* 2006;87(5):1075–84.
33. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *J Hepatol. European Association for the Study of the Liver;* 2014;61(3):660–71.
34. André P, Perlemuter G, Budkowska A, Bréchet C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis.* 2005;25:93–104.
35. Paul D, Madan V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus RNA replication and assembly: Living on the fat of the land. *Cell Host Microbe* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;16(5):569–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.008>

36. Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;285(139–73).
37. Ke PY, Chen SS. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses*. 2012. 2251-2290 p.
38. Vercauteren K, De Jong YP, Meuleman P. HCV animal models and liver disease. *J Hepatol* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2014;61(1):S26–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.013>
39. Lohmann V, Körner F, Koch J-O, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* (80-). 1999 Jul 2;285(5424):110–3.
40. Amako Y, Tsukiyama-Kohara, K Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*. *J Virol*. 2010;84:303–11.
41. Frentzen A, Anggakusuma, Gurlevik E, Hueging K, Knocke S, Ginkel C. Cell entry, efficient RNA replication, and production of infectious hepatitis C virus progeny in mouse liver-derived cells. *Hepatology*. 2014;59:78–88.
42. Dorner M, Horwitz J a, Donovan BM, Labitt RN, Budell WC, Friling T, et al. Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature*. Nature Publishing Group; 2013;501(7466):237–41.
43. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005;11:791–6.
44. Lindenbach B, Evans M, Syder A, Wolk B, Tellinghuisen T, Liu C, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* (80-). 2005;309:623–6.
45. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton D, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:9294–9.
46. Choi J, Lee KJ, Zheng Y, Yamaga AK, Lai MMC, Ou JH. Reactive oxygen species suppress hepatitis C virus RNA replication in human hepatoma cells. *Hepatology*. 2004;39(1):81–9.
47. Xu Z, Choi J, Lu W, Ou J. Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 2003;77(2):1578–83.
48. Tardif KD, Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2015 Jan 8];13(4):159–

63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817385>
49. Choi J. Oxidative stress, endogenous antioxidants, alcohol, and hepatitis C: pathogenic interactions and therapeutic considerations. *Free Radic Biol Med*. Elsevier Inc.; 2012 Apr 1;52(7):1135–50.
 50. Joyce M a, Walters K-A, Lamb S-E, Yeh MM, Zhu L-F, Kneteman N, et al. HCV induces oxidative and ER stress, and sensitizes infected cells to apoptosis in SCID/Alb-uPA mice. *PLoS Pathog* [Internet]. 2009 Feb [cited 2015 Jan 8];5(2):e1000291. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2647842&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 51. Levent G, Ali A, Ahmet A, Polat EC, Aytaç C, Ayşe E, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J Transl Med*. 2006 Jan;4:25.
 52. Abdalla MY, Ahmad IM, Spitz DR, Schmidt WN, Britigan BE. Hepatitis C virus-core and non structural proteins lead to different effects on cellular antioxidant defenses. *J Med Virol*. 2005 Aug;76(4):489–97.
 53. Bhargava A, Raghuram G V., Pathak N, Varshney S, Jatawa SK, Jain D, et al. Occult hepatitis C virus elicits mitochondrial oxidative stress in lymphocytes and triggers PI3-kinase-mediated DNA damage response. *Free Radic Biol Med*. Elsevier Inc.; 2011;51(9):1806–14.
 54. Ivanov A, Smirnova O, Petrushanko I, Ivanova O, Karpenko I, Alekseeva E, et al. HCV Core Protein Uses Multiple Mechanisms to Induce Oxidative Stress in Human Hepatoma Huh7 Cells. *Viruses* [Internet]. 2015;7(6):2745–70. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/7/6/2745/>
 55. Paracha UZ, Fatima K, Alqahtani M, Chaudhary A, Abuzenadah A, Damanhour G, et al. Oxidative stress and hepatitis C virus. *Viol J. Virology Journal*; 2013 Jan;10(1):251.
 56. Qadri I, Iwahashi M, Capasso JM, Hopken MW, Flores S, Schaack J, et al. Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. *Biochem J*. 2004;378(Pt 3):919–28.
 57. Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, et al. Boceprevir for previously treated chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364(13):1207–17.
 58. US Food and Drug Administration. FDA approves new treatment for chronic hepatitis C genotype 3 infections. 2015.
 59. Tamori A, Enomoto M, Kawada N. Recent Advances in Antiviral Therapy

for Chronic Hepatitis C. *Mediators Inflamm.* 2016;2016.

60. Abbvie. Highlights of prescribing information-Viekira XR [Internet]. 2014. 2014 [cited 2016 Oct 11]. Available from: http://www.rxabbvie.com/pdf/viekiraxr_pi.pdf
61. El-Shamy A, Hotta H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: An overview. *World J Gastroenterol.* 2014;20(24):7555–69.
62. Martínez-Gómez LE, Chávez-Tapia NC, Burguete-García AI, Aguilar-Olivos N, Madrid-Marina V, Román-Bahena M, et al. IL28B polymorphisms predict the response to chronic hepatitis C virus infection treatment in a Mexican population. *Ann Hepatol.* 2012;11(6):876–81.
63. Wohnsland A, Hofmann W, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):23–38.
64. Ampuero J, Romero-Gómez M, Reddy KR. HCV genotype 3 - The new treatment challenge. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(7):686–98.
65. Flores-Contreras L, Sandoval-Rodríguez AS, Mena-Enriquez MG, Lucano-Landeros S, Arellano-Olivera I, Álvarez-Álvarez A, et al. Treatment with pirfenidone for two years decreases fibrosis, cytokine levels and enhances CB2 gene expression in patients with chronic hepatitis C. *BMC Gastroenterol.* 2014;14(131).
66. FDA. FDA approves Esbriet to treat idiopathic pulmonary fibrosis. 2014.
67. Arif A, Levine R, Sanderson S. Regression of fibrosis in chronic hepatitis C after therapy with interferon and ribavirin. *Dig Dis Sci.* 2003;48(7):1425–30.
68. Lu SC. S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(4):391–5.
69. Frau M, Tomasi ML, Simile MM, Demartis MI, Salis F, Latte G, et al. Role of transcriptional and posttranscriptional regulation of methionine adenosyltransferases in liver cancer progression. *Hepatology.* 2012;56(1):165–75.
70. Kotb M, Mudd SH, Mato JM, Geller AM, Kredich NM, Chou JY, et al. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. *Trends Genet.* 1997 Feb;13(2):51–2.
71. Horikawa S, Tsukada K. Molecular cloning and developmental expression of a human kidney S-adenosylmethionine synthetase. *FEBS Lett.* 1992 Nov 2;312(1):37–41.

72. Horikawa S, Ozasa H, Ito K, Katsuyama I, Tsukada K, Sugiyama T. Expression of S-adenosylmethionine synthetase isozyme genes in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Mol Biol Int*. 1996 Nov;40(4):807–14.
73. Alvarez L, Corrales F, Martín-Duce A, Mato JM. Characterization of a full-length cDNA encoding human liver S-adenosylmethionine synthetase: tissue-specific gene expression and mRNA levels in hepatopathies. *Biochem J*. 1993 Jul 15;293 (Pt 2)(2):481–6.
74. García-Trevijano ER, Latasa MU, Carretero M V, Berasain C, Mato JM, Avila M a. S-adenosylmethionine regulates MAT1A and MAT2A gene expression in cultured rat hepatocytes: a new role for S-adenosylmethionine in the maintenance of the differentiated status of the liver. *FASEB J*. 2000;14(15):2511–8.
75. Mato JM, Lu SC. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology*. 2007 May;45(5):1306–12.
76. Avila MA, Berasain C, Torres L, Martín-Duce A, Corrales FJ, Yang H, et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2000;33(6):907–14.
77. Majano PL, García-Monzón C, García-Trevijano ER, Corrales FJ, Cámara J, Ortiz P, et al. S-Adenosylmethionine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in rat liver and isolated hepatocytes. *J Hepatol*. 2001;35(6):692–9.
78. Li TW, Zhang Q, Oh P, Xia M, Chen H, Bermanian S, et al. S-Adenosylmethionine and methylthioadenosine inhibit cellular FLICE inhibitory protein expression and induce apoptosis in colon cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2011;76(1):192–200.
79. Li TW, Yang H, Peng H, Xia M, Mato JM, Lu SC. Effects of S-adenosylmethionine and methylthioadenosine on inflammation-induced colon cancer in mice. *Carcinogenesis*. 2012;33(2):427–435.
80. Lu SC, Mato JM. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;Suppl. 1:S73–S77.
81. Schmidt T, Leha A, Salinas-Riester G. Treatment of prostate cancer cells with S-adenosylmethionine leads to genome-wide alterations in transcription profiles. *Gene*. 2016;S0378-1119(16):30770–3.
82. Feld JJ, Modi AA, Eldiwany R, Rotman Y, Thomas E, Ahlenstiel G, et al. S-adenosyl methionine improves early viral responses and interferon-stimulated gene induction in hepatitis C nonresponders. *Gastroenterology*. 2011;140(3):830–9.

83. Fernández-Checa JC, Colell A, García-Ruiz C. S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial reduced glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* [Internet]. 2002;27(3):179–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163147>
84. Vendemiale G, Altomare E, Trizio T, Le Grazie C, Di Padova C, Salerno M, et al. Effects of oral S-adenosyl-L-methionine on hepatic glutathione in patients with liver disease. *Scand J Gastroenterol*. 1989;24(4):407–15.
85. Cavallaro RA, Fuso A, Nicolia V, Scarpa S. S-Adenosylmethionine Prevents Oxidative Stress and Modulates Glutathione Metabolism in TgCRND8 Mice Fed a B-Vitamin Deficient Diet. *J Alzheimer's Dis*. 2010;20(4):997–1002.
86. Tomasi ML, Ramani K, Lopitz-Otsoa F. S-Adenosylmethionine Regulates Dual-Specificity Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase Expression in Mouse and Human Hepatocytes. *Hepatology*. 2010;51(6):2153–21.
87. Kharbanda KK, Bardag-Gorce F, Barve S, Molina PE, Osna NA. Impact of Altered Methylation in Cytokine Signaling and Proteasome Function in Alcohol and Viral-Mediated Diseases. *Alcohol Clin Exp Res*. 2013;37(1):1–7.
88. Nassif ND, Cambray SE, Kraut DA. Slipping up: Partial substrate degradation by ATP-dependent proteases. *IUBMB Life*. 2014;66(5):309–317.
89. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf D. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25200–9.
90. Osna NA, White RL, Krutik VM, Wang T, Weinman SA, Donohue Jr TM. Proteasome Activation by Hepatitis C Core Protein is Reversed by Ethanol-Induced Oxidative Stress: Proteasome activation by HCV core protein. *Gastroenterology*. 2008;134(7):2144–52.
91. De Weerd N, Samarajiwa S, Hertzog P. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20053–20057.
92. Cohen B, Parkin J. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777–89.
93. Levy DE. Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption in vivo. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55:1559–1567.
94. Bandyopadhyay SK, Leonard GT, Bandyopadhyay T, Stark GR, Sen GC. Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-inducible response elements without activation of interferon-

- stimulated gene factor 3. *J Biol Chem.* 1995;270:19624–19629.
95. Ramana C V., Gil MP, Han Y, Ransohoff RM, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:6674–6679.
 96. Gil MP, Bohn E, O'Guin AK, Ramana C V., Levine B, Stark GR, et al. Biologic consequences of Stat1- independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:6680–6685.
 97. Duong FT, Christen V. S-Adenosylmethionine and Betaine Correct Hepatitis C Virus Induced Inhibition of Interferon Signaling In Vitro. *Hepatology.* 2006;43(4):796–795.
 98. van Liempd S, Cabrera D, Mato J, Falcon-Perez J. A fast method for the quantitation of key metabolites of the methionine pathway in liver tissue by high-resolution mass spectrometry and hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(15):5301–10.
 99. Lozano-Sepulveda SA, Bautista-Osorio E, Merino-Mascorro JA, Varela-Rey M, Muñoz-Espinosa LE, Cordero-Perez P, et al. S-adenosyl-L-methionine modifies antioxidant-enzymes, glutathione-biosynthesis and methionine adenosyltransferases-1/2 in hepatitis C virus-expressing cells. *World J Gastroenterol.* 2016;22(14):3746–57.
 100. Lee HS, Lim YS, Park EM, Baek SH, Hwang SB. SUMOylation of nonstructural 5A protein regulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat.* 2014;21(10):e108–17.
 101. Coburn C, Meinke P, Chang W. Discovery of MK-8742: an HCV NS5A inhibitor with broad genotype activity. *Chem Med Chem.* 2013;12:1930–1940.
 102. Krishnan P, Beyer J, Koev G. Antiviral activity and resistance profiles for ABT-267, a Novel HCV NS5A inhibitor, in vitro and during 3-day monotherapy in hcv genotype-1 (gt1)-infected treatment-naive subjects. *Hepatology.* 2012;56:1069A.
 103. Wells JT, Landaverde C, Gutierrez J, Lawitz E. Management of patients with hepatitis C virus resistance-associated variants to NS5A inhibitors: Where are we now? *Clin Liver Dis.* 2015;6(4):82–5.
 104. Rivas Estilla AM, Bryan Marrugo OL, Trujillo Murillo K, Perez Ibañez D, Charles Nino C, Pedroza Roldan C, et al. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) induction is implicated in the antioxidative and antiviral activity of acetylsalicylic acid in HCV-expressing cells. *AJP Gastrointest Liver Physiol.* 2012;302(11):G1264–73.
 105. Wang Y, Li J, Wang X, Ye L, Zhou Y, Ho W. Induction of interferon- γ

- contributes to Toll-like receptor-3 activated hepatic stellate cell-mediated hepatitis C virus inhibition in hepatocytes. *J Viral Hepat.* 2013;20(6):385–94.
106. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, et al. E6AP Ubiquitin Ligase Mediates Ubiquitylation and Degradation of Hepatitis C Virus Core Protein. *J Virol.* 2007;81(3):1174–85.
 107. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, et al. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology.* 2010;52:411–420.
 108. Munakata T, Liang Y, Kim S, McGivern D, Huibregtse J, Nomoto A, et al. Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog.* 2007;3:1335–1347.
 109. Tomasi ML, Tomasi I, Ramani K, Pascale RM, Xu J, Giordano P, et al. S-adenosylmethionine Regulates Ubiquitin-Conjugating Enzyme 9 Protein Expression and Sumoylation in Murine Liver and Human Cancers. *Hepatology.* 2012;56(3):982–93.
 110. Ivashki LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:36–49.
 111. Kim Y, Lee S, Park S, Song K. Gene structure of the human DDX3 and chromosome mapping of its related sequences. *Mol Cells.* 2002;12(2):209–14.
 112. Schröder PC, Fernández-Irigoyen J, Bigaud E, Serna A, Renández-Alcoceba R, Lu SC, et al. Proteomic analysis of human hepatoma cells expressing methionine adenosyltransferase I/III. Characterization of DDX3X as a target of S-adenosylmethionine. *J Proteomics [Internet]. Elsevier B.V.;* 2012;75(10):2855–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.009>
 113. Chang P, Chi C, Chau G, Li F, Tsai Y, Wu J. DDX3, a DEAD box RNA helicase, is deregulated in hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma and is involved in cell growth control. *Oncogene.* 2006;25:1991–2003.

ANEXOS

Protocolos generales y preparación de reactivos

Protocolos

1. Congelación de células

1. Retirar el medio de una botella de 75 cm² con confluencia de 90%, la cual contiene aproximadamente entre 5 y 7 millones de células.
2. Lavar con PBS 1x.
3. Tripsinizar con 3 mL de tripsina por 5-7 min a 37°C. Transcurrido el tiempo, se debe verificar que las células se han despegado macro o microscópicamente.
4. Inactivar con un volumen igual de medio con suero (3 mL).
5. Transferir las células a un tubo Falcon de 15 mL, centrifugar por 5 min a 1000 rpm para formar un botón. Retirar el sobrenadante de medio de cultivo y tripsina inactivada.
6. Resuspender en el volumen adecuado de SFB (900 µL por cada vial a preparar).
7. Depositar en cada vial 100 µL de DMSO y 900 µL de células resuspendidas en SFB. Agitar suavemente, flamear, sellar con parafilm y rotular.
8. Dejar reposar en hielo por 5 min, luego 2 h a -20°C y almacenar a -80°C hasta su uso.

Observaciones:

* Cada mL de mezcla para congelar debe contener 1-2 millones de células.

* Para congelar puede usarse medio de cultivo con un alto porcentaje de SFB, pero se obtienen mejores resultados en la preservación al congelar sólo en SFB con un 10% de DMSO.

* De la temperatura de -80°C , las células pueden transferirse a un contenedor de nitrógeno líquido para extender su vida útil.

2. Descongelación de células

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

Observaciones:

* Una vez que se atempera no se pueden congelar de nuevo las células.

3. Cultivo y subcultivo de la línea celular Huh-7 parental y Huh7-VHC replicón

1. Revisar las células al microscopio en 10x y 40x para corroborar que se encuentren a un 90-95% de confluencia.
2. Retirar el medio por aspiración.
3. Lavar con PBS 1x, botellas de 75 cm^2 con 5 mL y de 25 cm^2 con 3 mL. Retirar el buffer por aspiración.
4. Adicionar tripsina (botellas de 75 cm^2 con 3 mL y de 25 cm^2 con 2 mL), incubar a 37°C por 5-7 min.

5. Neutralizar usando medio de cultivo con suero en proporción 1:1 respecto a la tripsina, agitando suavemente de un lado a otro para mezclar.
6. Colocar el contenido de un tubo Falcon de 15 mL para centrifugar 5 min a 1000 rpm y formar una pastilla.
7. Remover el medio y la tripsina inactivada con puntilla estéril o pipeta estéril, evitando tocar el botón de células. Resuspender en el volumen apropiado de medio nuevo, 2 mL por cada botella de 75 cm².
8. Tomar la alícuota correspondiente de la resuspensión celular según la cantidad de células a conservar.
9. Depositar en botellas nuevas o reusadas acondicionadas con medio nuevo suplementado y geneticina en el caso de las células replicón.

Observaciones:

- * La tripsina no debe dejarse por más de 10 min.
- * A botellas de 75 cm² se les adicionan 10 mL de medio. Para botellas de 25 cm² es suficiente con 5 mL.
- * Deben adicionarse 5 µL de geneticina (100 mg/mL) por cada mL de medio de cultivo.
- * Las botellas pueden reutilizarse para subcultivos, previo lavado con PBS 1x para eliminar residuos.

4. Conteo y viabilidad celular con azul de tripano

1. Retirar el medio de cultivo de la botella por aspiración y lavar con 3-4 mL de PBS 1x.
2. Tripsinizar con 3 mL de tripsina por 5 min a 37°C e inactivar con un volumen igual de medio con suero.
3. Depositar en un tubo falcon de 15 mL y centrifugar a 1000 rpm por 5 min.

4. Retirar el sobrenadante y resuspender en 3 mL, o el volumen adecuado según el tamaño del botón celular, de medio nuevo.
5. Preparar en un tubo eppendorf de 0.3 mL una mezcla de 60 μ L de medio, 10 μ L de azul de tripano y 10 μ L de las células resuspendidas a modo de tener una dilución 1:8. Los volúmenes pueden ajustarse según las necesidades particulares tomando nota de la dilución.
6. Contar en la cámara de Neubauer en los 4 cuadros grandes, en el cuadro del centro o en ambos para corroborar el cálculo. El número de células por mL se estima según las siguientes fórmulas:

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

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

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

Observaciones:

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

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

5. Siembra en placas de cultivo

1. Con las células contadas (células/mL), se toma el volumen que contenga el número de células deseadas y se mezcla con el volumen total de medio de cultivo para sembrar las placas correspondientes.
2. Mezclar suavemente por agitación y observar al microscopio.

3. Incubar a 37°C con 5% de CO₂ el tiempo establecido de acuerdo al experimento a realizar.

Observaciones:

* La adhesión de las células debe permitirse en un tiempo de 12-16 h.

6. Extracción de RNA total

Fase de homogenización

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

Fase de separación

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

Precipitación del RNA

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

Lavado

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

7. Retrotranscripción (RT-PCR)

1. Cada una de las muestras de RNA se descongelan cuidadosamente en hielo y de preferencia una sola vez, para disminuir la degradación del RNA.
2. Marcar un microtubo para PCR con la leyenda Mix 1 y otro con Mix 2.
3. Al microtubos marcado con Mix 1, se le agregan los siguientes componentes:
 - a. 5,5 μ L de H₂O DEPC
 - b. 1 μ L de Random Primers
 - c. 5 μ L del RNA extraído en el procedimiento anterior.
4. Incubar el Mix 1 a 72°C durante 10 minutos en el termociclador.
5. Durante la incubación del Mix 1, se procede a preparar el Mix 2, al cual se le agregan los siguientes componentes:
 - a. 4 μ L de Buffer RT 5x.
 - b. 2 μ L de DTT 0,1 M
 - c. 0,5 μ L de RNasa-Out 40 U/ μ L
 - d. 1 μ L de dNTP's
 - e. 1 μ L de M-MLV 200 U/ μ L
6. Luego de terminar la incubación, el tubo rotulado como Mix 1 se coloca en hielo durante 3 minutos.
7. Pasado este tiempo, se toman los 8,5 μ L del tubo rotulado como Mix 2 y se mezclan con el contenido del Mix 1.
8. La mezcla de los dos Mix se coloca en el termociclador para continuar con el siguiente orden de temperaturas:
 - a. 10 minutos a 25°C
 - b. 1 hora a 37°C
 - c. 5 minutos a 94°C
 - d. 30 minutos a 4°C
9. Una vez terminado, se almacenan a -20°C hasta su uso.

8. qPCR

Posteriormente se realiza la qPCR siguiendo las siguientes indicaciones:

1. Realizar un mix para todas las muestras a analizar conteniendo la sonda y el master mix o los primers y el sybr master mix.
2. Añadir a cada tubo 11 μL de la mezcla (10 Master mix y 1 de sonda), en el caso de las reacciones con sondas, y 12 μL de la mezcla (10 sybr master mix y 1 μL de cada primer) en el caso de las reacciones utilizando sybr Green.
3. Añadir la cantidad de cDNA estipulada.
4. Completar con agua DEPC a la cantidad de 20 μL .
5. Tapar cuidadosamente los tubos sin tocar la parte superior de la tapa y usando toallas libres de polvo.
6. Colocar los tubos en el equipo y especificar el protocolo de reacción en reacción estándar, cuantificación relativa $\Delta\Delta\text{Ct}$ y uso de sonda taqman y/o syber Green.
7. En la tabla se presentan las condiciones de ciclos de la qPCR.

Paso 1	50°C - 2'
Paso 2	95°C - 10'
Paso 3	95°C - 15"
Paso 4	60°C - 1'
Paso 5	Repetir 40 veces paso 3 y 4

Ciclos de qPCR

9. Extracción de proteínas.

1. Eliminar el medio de la placa con pipeta y puntilla desechable.
2. Agregar 1 mL de PBS frío para humedecer la superficie.
3. Añadir el buffer de lisis 1x preparado recientemente, según el diámetro y la cantidad de células a lisar.

4. Raspar con scraper o raspador plástico estéril el contorno de la mitad de la caja y el centro en un solo sentido, girando la placa en sentido de las manecillas de reloj, a modo de coleccionar las células en todas las posiciones.
5. Transferir el líquido a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
6. Dar vortex de 10 s e incubar en hielo por 20 min.
7. Centrifugar 5 min, a 13,000 rpm a 4°C.
8. Retirar el sobrenadante (proteína) y pasarlo a un tubo nuevo.
9. Almacenar a -80°C hasta su uso.

Observaciones:

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

10. Cuantificación por el método de Bradford

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

Blanco 160 µL de agua miliQ + 40 µL de reactivo de Bradford

Muestra 159 µL de agua miliQ + 40 µL de reactivo de Bradford + 1 µL de extracto de proteína sin diluir o diluido 1:3 o 1:5

2. Dejar reposar la reacción, luego de mezclar bien, por 5 min.
3. Leer en el lector de placa a 600 nm.
4. Estimar la concentración haciendo el cálculo correspondiente con la ecuación de la recta previamente obtenida en una curva estándar de referencia.

Observaciones:

* Una vez preparada la reacción es estable por 1 h.

11. SDS-PAGE

1. Preparar un gel de poliacrilamida de 7x10 cm con el gel separador a una concentración de 12% y el concentrador al 5%. Dejar polimerizar.
2. Tomar 40 μg de proteína y mezclar con buffer de carga 4X en una proporción 1:4.
3. Desnaturalizar las proteínas calentado a 95°C por 5 min en termomixer y poner en hielo.
4. Armar la cámara, poner buffer de corrida 1X y cargar las muestras, incluyendo el marcador de peso molecular.
5. Correr a 80-100 V por aproximadamente 2 h.
6. Desmontar el gel y continuar con la transferencia.

12. Transferencia a la membrana de PVDF.

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

13. Western Blot

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

14. Quimioluminiscencia

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

15. Eliminación de anticuerpos (Stripping out)

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

16. Determinación de ROS por DCFH-DA

1. Sembrar alrededor de 17 mil células en placas negras de 96 pozos.
2. Aplicar los tratamientos correspondientes.
3. A los 30 min antes de cumplirse el tratamiento, añadir 2 μ L de DCFH 0.5 mM para obtener una concentración final en el pozo de 5 μ M.
4. Forrar la placa con aluminio e incubar los 30 min a 37 °C.
5. Leer en un lector de fluorescencia para placas a una longitud de onda de excitación de 503 nm y de emisión de 529 nm.

17. Curva de calibración para cuantificación de SAM por UPLC

Para las muestras de la curva de calibración, 18 alícuotas de células Huh7-VHC replicón fueron procesadas de la misma manera que las muestras con la finalidad de crear una matriz similar a la presente en las muestras de las células. Las muestras de calibración fueron resuspendidas en 100 μ L de estándares del analito diluidos de manera seriada la concentración mas alta del analito fue 100 μ M. Además también fueron incluidas 6 alícuotas sin el analito adicionado. Para la señal del analito, el promedio de la señal de las muestras sin adición del analito fue restado de las muestras de calibración con analito adicionado con la finalidad de eliminar la señal de línea base para crear la curva de calibración. La curva de calibración fue creada con la función, $y = a \cdot x^b$, donde y fue la señal y x la concentración del analito.

Preparación de Reactivos

I. Cultivo Celular

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

Para 500 mL,

Suero 2% 10 mL

Glutamina 1% 5 mL

Aminoácidos no esenciales 1% 5 mL

Antibiótico 1% 5 mL

2. Buffer PBS 1x

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

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

3. Geneticina

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

por una semana. La geneticina recién preparada no puede ocuparse hasta que se demuestre su esterilidad.

II. Electroforesis

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

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

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

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

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

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

3. Buffer de corrida 5x

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

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

4. Gel de Poliacrilamida de 7x10 cm por 1.5 mm de grosor

	Separador (12%)	Concentrador (5%)
Agua miliQ (mL)	2.8	3.65
Poliacrilamida al 30% (mL)	3.7	0.625
Buffer* (mL)	3.3	1.7
SDS 10% (μL)	100	50
PSA 10% (μL)	100	50
TEMED (μL)	10	5
	10.01 mL	6.08 mL

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

5. Buffer de carga 4X

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

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

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

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

Pesar 100 mg de reactivo sólido en tubos eppendorf y guardar a -20°C protegidos de la luz. Agregar 1 mL de agua destilada justo antes de usar.

8. Inhibidor de proteasas

Disolver 1 tableta de Complete (Roche) en 1 mL de agua.

III. Western blot

1. Buffer de transferencia 10 X

Tris Base 25mM 60.6gr

Glicina 192mM 288gr

Agua destilada 2000 ml

2. TBS 10X

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

3. TBS-Tween 1X

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

4. Buffer de bloqueo con leche 5%

Reactivo	Cantidad
Leche descremada en polvo	2.5 g
TBS-Tween 1X	50 mL

5. Solución de Ponceau 0.1 %

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

Aforar a 200 mL con agua destilada

6. Diluciones de anticuerpos

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

7. Buffer de stripping 1X

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

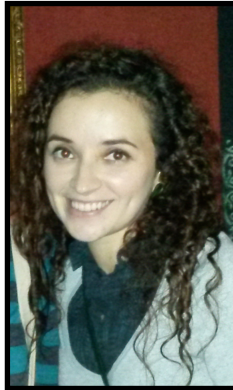
Aforar a 500 mL con agua destilada.

IV. Determinación de ROS

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

Se preparó también peróxido de hidrógeno al 0.2 M a partir de una solución al 0.88 M. Se tomaron 227 μL de la solución concentrada y se diluyeron con 773 μL de agua MiliQ estéril para obtener la concentración final de 0.2 M.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Sonia Amelia Lozano Sepúlveda

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Tesis: Evaluación de la participación de la S-adenosil metionina (SAM) y su mecanismo de acción en la regulación de la expresión génica del VHC

Campo de Estudio: Biología Molecular

Biografía:

Datos Personales: Nacida el 19 de Junio de 1987 en Guadalupe, Nuevo León, México. Hija de Álvaro Lozano Lozano y Sonia A. Sepúlveda Martínez.

Educación:

- Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Ciencias Químicas, UANL (2004-2008).
- Maestra en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética por la Facultad de Medicina, UANL (2011).

e-mail: s.lozanosepulveda@gmail.com