

Rol de la proteína codificada por el ORF3 del Virus de la Hepatitis E (*HEV*) en la apoptosis y la proliferación celular *in vitro*

Tesina de Grado. Licenciatura en Bioquímica

Bach. Lucía García Inciarte

Tutor: Dr. Santiago Mirazo

Co-tutor: Dr. Juan Arbiza

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Santiago por darme la oportunidad de llevar a cabo esta tesina, proyecto en el que aprendí del mundo de la investigación.

A toda la Cátedra de Virología. A los chicos Nati, Flo C., Flo O., Lu y especialmente Daro y Romi por la mano gigante que me extendieron en todo momento.

A la ANII por brindar el apoyo para que como alumnos podamos incluirnos en proyectos como este y así poder seguir aprendiendo.

Al Institut Pasteur de Montevideo por facilitarnos sus instalaciones, esenciales para llevar a cabo este trabajo.

A Sabina Victoria por la ayuda inmensa, muy por encima de sus tareas.

A Genia y todos mis amigos y compañeros por el inmenso apoyo y consideración para que pudiera terminar la carrera.

A mis amigos por la Fe indescriptible: Manés, Chevy, Vale, Magui, Flo, Hache, Jose, Dani, Cami, Mimi, Vale S., Leo, Joaco, Cares, Diego A., Diego, Sofi, Santi, Xime y Fefa.

A mis tías Meri y Popi y a mis abuelas por el optimismo inagotable.

A mi familia: Mamá, Walter, Mer, Nico y Papá por el apoyo incondicional y por creer más en mi que yo misma.

Para mi abuelo, que sé que está feliz y muy orgulloso, lo comparto contigo...

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 INTRODUCCIÓN A LA HEPATITIS E	8
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	9
1.3 HEPATITIS E EN URUGUAY	11
1.4 EL VIRUS HEV	12
1.5 VÍAS DE TRANSMISIÓN	14
1.6 ESTRUCTURA Y GENOMA VIRAL.....	16
1.7 ORF3.....	18
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
HIPÓTESIS DE TRABAJO	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 OBTENCIÓN DEL ORF3 DE HEV.....	23
2.2 CLONADO DE ORF3 EN PEGFP-C1	25
2.3 CÉLULAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	27
2.4 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS	28

2.5 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	30
2.6 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR POR RECuento.....	32
2.7 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE ENSAYO DE MTT	32
2.8 ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS CELULAR MEDIANTE TINCIÓN CON DAPI POR EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL NÚCLEO Y CONTEO DE NÚCLEOS	33
2.9 ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS MEDIANTE RECuento CELULAR	34
3. RESULTADOS	36
3.1 OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO PEGFP CON EL GEN ORF3 DEL HEV	36
3.2 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS	37
3.3 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN POR RECuento CELULAR.....	41
3.4 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR A TRAVÉS DEL ENSAYO DE MTT.....	42
3.5 EVALUACIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS POR TINCIÓN CON DAPI POR EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL NÚCLEO Y CONTEO DE NÚCLEOS	43
3.6 EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS MEDIANTE RECuento CELULAR	47
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	53
PERSPECTIVAS	54
BIBLIOGRAFÍA	55

ABREVIATURAS

- ✘ ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ✘ ARN: Ácido ribonucleico
- ✘ CAP 5': Caperuza 5'
- ✘ c-Met: Tirosin-proteín quinasa Met
- ✘ DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
- ✘ dNTP: desoxinucleótidos
- ✘ Dominio *M*: Dominio *Middle*
- ✘ Dominio *P*: Dominio *Protruding*
- ✘ Dominio *S*: Dominio *Shell*
- ✘ EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- ✘ EGFR: *Epidermic Growth Factor Receptor* (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)
- ✘ g: Gramos
- ✘ GMEM: *Glasgow Minimum Essential Medium* (Medio mínimo esencial de Glasgow)
- ✘ GFP: *Green Fluorescent Protein*
- ✘ HEV: Virus de la Hepatitis E (del inglés, *Hepatitis E Virus*)
- ✘ Ig: Inmunoglobulina
- ✘ Kb: Kilobases
- ✘ LB: Medio de cultivo Luria Bertani
- ✘ mg: Miligramo
- ✘ mL: Mililitro
- ✘ mM: Milimolar
- ✘ MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- ✘ Neo: Neomicina fosfotransferasa
- ✘ nM: Nanómetro
- ✘ OptiMEM: *Reduced-Serum Medium* (Medio reducido en suero)
- ✘ ORF: *Open Reading Frame* (Marco abierto de lectura)
- ✘ Pb: Pares de bases
- ✘ PBS: Fosfato *Buffer* Salino

- ✦ *PCR: Polimerase Chain Reaction*
- ✦ Poli-A: Cola poliadenilada
- ✦ pro*ORF3*: Proteína codificada por el gen *ORF3*
- ✦ r.p.m.: Revoluciones Por Minuto
- ✦ TAE: Tris Acetato EDTA
- ✦ UTR: *Untranslated Region* (Regiones no traducidas)

RESUMEN

El Virus de la Hepatitis E (*HEV*) perteneciente a la familia *Hepeviridae* es uno de los principales agentes causante de hepatitis en regiones endémicas. El *HEV* se distribuye principalmente en países en vías de desarrollo, frecuentemente causando epidemias. Existen cuatro genotipos del virus HEV que afectan a humanos. El virus HEV posee una cápside icosaédrica, sin envoltura. Su genoma consiste en una sola hebra de ARN de polaridad positiva que incluye tres marcos abiertos de lectura (*ORF*) que codifican para todas las proteínas necesarias para su proliferación e infectividad. La región *ORF3* codifica una fosfoproteína inmunogénica (*proORF3*) que se asocia con el citoesqueleto celular. La función exacta de esta proteína aún no se ha determinado en profundidad. Se cree que *proORF3* interactúa con la fosfatasa quinasa celular activada por mitógenos y otras quinasas extracelulares, promoviendo la sobrevivencia de la célula durante la activación de vías de señalización intracelulares. En este proyecto se buscó evaluar la función de la proteína codificada por *ORF3* en la proliferación y apoptosis celular. Para esto se utilizaron técnicas de clonado del gen *ORF3* en un vector de expresión y transfección del mismo en células A549 para proceder con los ensayos de proliferación y apoptosis celular. Para evaluar el rol de *proORF3* en la proliferación celular se realizó el recuento celular, así como ensayos colorimétricos con sales de tetrazolio. No se observaron diferencias en la proliferación. Para evaluar cómo afecta la expresión del gen *ORF3* frente a la inducción de la apoptosis celular se analizó el número y la morfología de los núcleos de las células mediante tinción con DAPI. En el recuento de núcleos, se observó una clara diferencia entre la proliferación de las células que expresaban *ORF3* y las células *wild type*, mostrando una importante inhibición de la muerte celular en la línea celular transfectada con el plásmido conteniendo el inserto *ORF3*. A partir de esto se puede inferir que la expresión del producto proteico del gen *ORF3* inhibe mediante algún mecanismo la muerte celular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a la Hepatitis E

La Hepatitis E es causada por el virus de la hepatitis E (*HEV*), calificado como un hepatótropo primario, es decir, un microorganismo con la capacidad de provocar una infección hepática. La clínica de esta infección es consecuencia de la necrosis de las células del hígado y la inflamación del parénquima hepático, equivalente a un cuadro de hepatitis aguda que provoca en los casos más graves una encefalopatía hepática asociada a una insuficiencia fulminante¹.

En 1955 se reportó el primer brote epidémico de la enfermedad². Ante un importante número de casos de infecciones en India, se sospechó que la sintomatología se correlacionaba con la de pacientes infectados por Virus de Hepatitis A (*HAV*, del inglés *Hepatitis A Virus*). Al proceder con análisis serológicos, no se halló rastros de inmunoglobulina M (IgM) anti-*HAV* que indicaran encontrarse frente a una infección reciente como se sospechaba². Este hallazgo sugirió la existencia de una nueva forma de hepatitis viral entéricamente transmitida. A pesar de este ser el primer brote documentado de la enfermedad, el agente viral y la enfermedad se identificaron como Hepatitis E en 1983 ante el surgimiento de una epidemia que afectó a soldados en Afganistán³. Un investigador voluntario ingirió una mezcla de extractos fecales de pacientes afectados para luego de padecer hepatitis aguda, encontrar en sus heces pequeñas partículas virales. Esto dio lugar a la posibilidad de clonar y secuenciar el genoma viral, y desarrollar herramientas para la detección de anticuerpos anti-*HEV*⁴.

La presentación clínica de la infección por *HEV* es esencialmente indistinguible de la observada en otros virus hepatótropos⁴. Mundialmente

se registran alrededor de 20 millones de casos anuales de infecciones por *HEV*⁵. La presentación más común (más de un 15% de los casos) de esta infección es en forma de hepatitis aguda, que afecta habitualmente a individuos de entre 15 y 40 años de forma autolimitada y sin secuelas⁵. La infección aguda cursa con formas que van de subclínica a hepatitis colestásica severa con ictericia, anorexia, náuseas, vómitos y fiebre⁵.

Las defunciones ocasionadas por este virus sobrepasan las 56 mil anuales, en su mayoría como consecuencia de una aguda insuficiencia hepática⁶. Se han encontrado casos de infección crónica por este virus en pacientes trasplantados hepáticos y renales⁷. La tasa de mortalidad a causa de HEV en zonas epidémicas es de aproximadamente un 10%, pero ese porcentaje alcanza el 20% en pacientes gestantes y más del 30% en la primera infancia, las poblaciones de mayor riesgo para esta infección⁷.

1.2 Epidemiología

El *HEV* causa grandes brotes de hepatitis que se dan con más frecuencia en aquellas zonas con climas caracterizados por sus altas temperaturas que en aquellas regiones templadas⁸. Normalmente, las epidemias de hepatitis E en lugares con estas particularidades ocurren durante los meses de invierno y los periodos de fuertes lluvias, cuando la contaminación es máxima⁸. El *HEV* se manifiesta especialmente en países que se encuentran en vías de desarrollo y se presenta en cualquiera de sus tres formas: epidémica, brotes aislados o infecciones esporádicas⁹. Aproximadamente un 20% de la población mundial residentes en áreas de mayor riesgo de contagio se ha infectado por el *HEV*¹⁰. Entre estas regiones se encuentran el sudeste Asiático, Asia Central, África del Norte, Este y Occidental, América del Norte y algunas

regiones de Centroamérica. Las epidemias de la mayoría de estas regiones han sido confirmadas serológicamente como hepatitis E⁶.

Desde la epidemia de Delhi en 1955 se ha incrementado la concientización del impacto que tiene *HEV* en la salud pública del sur de Asia y de zonas del mundo en desarrollo. Numerosos brotes han sido reportados tanto de áreas urbanas como rurales^{11,12}. Extrapolando brotes documentados y casos esporádicos de la enfermedad, se estima que solo en India, un país considerado como altamente endémico, surgen 2.2 millones de casos de Hepatitis E por año¹³. Entre 1955 y 1956, se observaron presuntas epidemias de hepatitis E en la antigua Unión Soviética y el sudeste Asiático incluyendo Birmania y Nepal^{14,15}.

En Estados Unidos y Europa la seroprevalencia varía entre 1 y 5%, en áreas urbanas¹⁴. En estas regiones, la mayoría de los afectados por la enfermedad se trataba, hasta hace unos años, de casos importados desde zonas endémicas. Sin embargo, actualmente el número de casos esporádicos es cada vez mayor. De hecho, cerca del 50% de casos esporádicos de hepatitis viral aguda en países en desarrollo han sido atribuidos a infecciones por *HEV*¹⁶. Se sugirió en estudios originados por el análisis del virus que se encontraba en el sistema de desagüe de zonas urbanas de España, Estados Unidos y otros países de Europa como Grecia, Francia y Suecia, que las cepas de hepatitis E al día de hoy se hallan más difundidas de lo esperado en estos países y otras regiones industrializadas¹⁷.

En Latinoamérica la hepatitis E fue detectada por primera vez en dos pueblos rurales ubicados en el sur de Ciudad de México en 1986¹⁸. Hacia el Sur del continente, se reportaron casos esporádicos en Argentina, Brasil y Bolivia, entre otros¹⁹. Por otra parte, se sugiere que la hepatitis E es endémica en el sur de Chile, específicamente en grupos étnicos de bajo nivel sociocultural²⁰. En Venezuela, anticuerpos anti-*HEV* se evidenciaron en mujeres embarazadas, aunque no se lo considera un

país endémico para la enfermedad²¹. En Cuba y Bolivia se reportan prevalencias mayores de anticuerpos anti-*HEV* con respecto a otros países latinoamericanos, también más significativas en zonas urbanas que en áreas rurales del altiplano y la Amazonia²².

A diferencia de los casos presentes en zonas endémicas, en regiones sin brotes epidémicos la hepatitis E representa solo una minoría de las hepatitis virales agudas, y hasta hace unos años la mayoría de ellos solían ser casos importados. Hoy en día se registran casos autóctonos esporádicos en zonas no endémicas, probablemente de origen zoonótico, aunque la transmisión parenteral entre humanos también ha sido documentada⁴.

1.3 Hepatitis E en Uruguay

A pesar de que en 1997 ya se habían obtenido resultados de prevalencia que indicaban que en Uruguay el 1,2% de una población de donantes de sangre presentaban inmunoglobulinas anti-*HEV*²³, no fue hasta el año 2011 que se reportaron los primeros casos autóctonos de la enfermedad²⁴.

En Uruguay se han detectado casos esporádicos de Hepatitis E en humanos, contraída probablemente por la ingesta de carnes y otros alimentos contaminados²³. Las infecciones fueron principalmente provenientes de cepas de genotipo 3²⁵, el más comúnmente encontrado en la región, aunque también se han detectado un caso asociado a genotipo 1²⁶.

Las cepas de *HEV* halladas en Uruguay presentan una importante similitud con las encontradas en Europa y su entorno, pero diferentes a los aislados de Brasil, Argentina y Bolivia²². La similitud entre las secuencias de las regiones hipervariables y su organización en grupos

monofiléticos de las cepas encontradas en Uruguay, sugiere que la presencia de *HEV* en nuestro país es muy reciente²⁶.

1.4 El virus *HEV*

El *HEV* es un virus perteneciente a la familia *Hepeviridae*, Género *Hepevirus*. Existen siete genotipos de este virus (*HEV1-7*), de los cuales solo cuatro infectan a seres humanos (Fig. 2). Los genotipos 5 y 6 se caracterizan por infectar a jabalíes, mientras que en camellos se ha reportado una cepa nueva denominada como genotipo *HEV7*²⁷. Los aislados de genotipo 1 y 2 se vinculan con la generación de importantes brotes epidémicos de Hepatitis E y se han relacionado con los cuadros clínicos más severos. Estos genotipos se han encontrado frecuentemente en aguas contaminadas de países en desarrollo que presentan importantes problemas sanitarios, principalmente en los continentes asiático y africano (Fig.1). Por otra parte, los genotipos 3 y 4 se encuentran en países desarrollados y en desarrollo, aunque no se manifiestan de forma endémica. Si bien la amplia mayoría de la transmisión zoonótica proviene de varias especies animales, los principales reservorios de las infecciones humanas son de origen suino (cerdos domésticos y jabalíes)³.

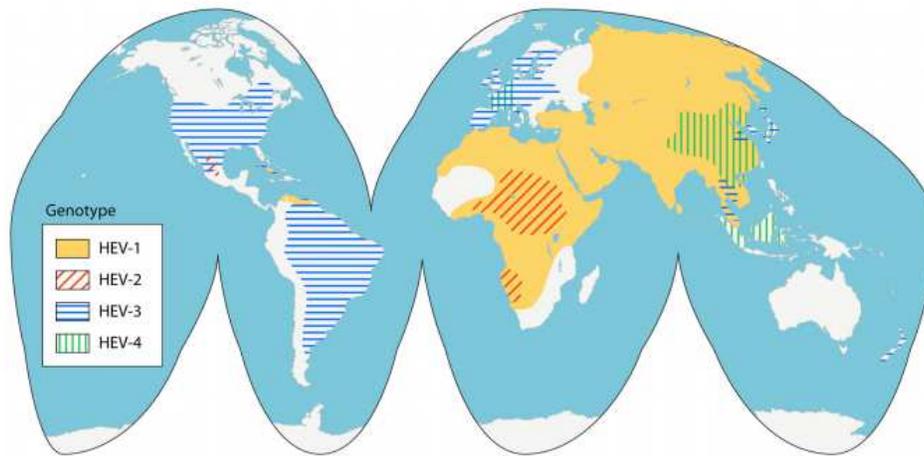


Figura 1: Distribución global de los distintos genotipos del Virus de Hepatitis E (HEV). El genotipo 2 fue identificado originalmente en México pero posteriormente fue encontrado en varias zonas del continente africano²⁸.

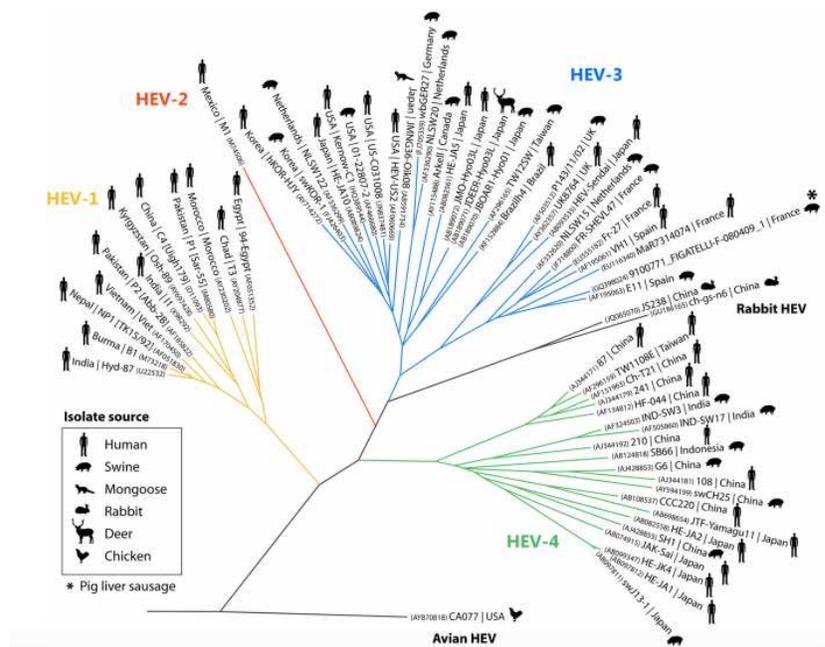


Figura 2: Árbol filogenético de aislados globales de HEV. Está basado en la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de la cápside. Los genotipos *HEV1* y *HEV2* afectan humanos, principalmente en África y Asia, mientras que los genotipos *HEV3* y *HEV4* tienen animales como reservorios y su transmisión frecuentemente implica alimentos provenientes de animales infectados¹⁹.

Por métodos filogenéticos se propuso como más conservado al genotipo 1 y se clasifica en 5 subtipos. El genotipo 2 presenta 2 subtipos, y los genotipos 3 y 4 son extremadamente diversos y pueden ser subdivididos en 10 y 7 subtipos, respectivamente⁶.

A los cinco subtipos de las secuencias del genotipo 1 de *HEV* se le asignan letras de la “a” a la “e” (1a-e). Este genotipo es responsable de la gran mayoría de los casos epidémicos y endémicos de infecciones por *HEV* en Asia, pero se encontraron pequeños brotes en Cuba y algunos casos esporádicos en Venezuela y Uruguay²⁵(Fig. 1). El genotipo 2 del virus se separa en solamente dos subtipos: 2a, prevalente en México, y el 2b, más comúnmente encontrado en África (Fig. 1). El genotipo 3 está ampliamente distribuido y sus secuencias son extremadamente diversas, comprendiendo diez subtipos (3a-j). Sin embargo el genotipo 4, a pesar de presentar una alta heterogeneidad dividiéndose en siete subtipos (4a-g), está restringido geográficamente a Asia y Europa Central. Esta clasificación en subtipos está siendo revisada²⁵.

1.5 Vías de transmisión

El *HEV* se puede transmitir por diferentes rutas (Fig. 3). La más frecuente es la ruta fecal-oral. La hepatitis E presenta mayores tasas de seroprevalencia en regiones de pobre sanidad, escasos recursos o acceso limitado a servicios esenciales como el suministro de agua potable, así como también a servicios de higiene y de salubridad. Debido a la pobre sanitización en algunas regiones del mundo, el consumo de aguas contaminadas por heces es una de las principales fuentes de transmisión fecal-oral de cepas de genotipos 1 y 2 del agente. El *HEV* es un patógeno transmitido entéricamente, por lo que son frecuentes las coinfecciones de *HEV* junto con el Virus de la Hepatitis A³. Esta vía de transmisión se da fundamentalmente debido a la resistencia del virus a las

condiciones ácidas y alcalinas del tracto intestinal, así como a las condiciones desfavorables del medio ambiente, aunque también se han observado casos de pacientes infectados mediante transfusiones de sangre o ingesta alimentaria⁴.

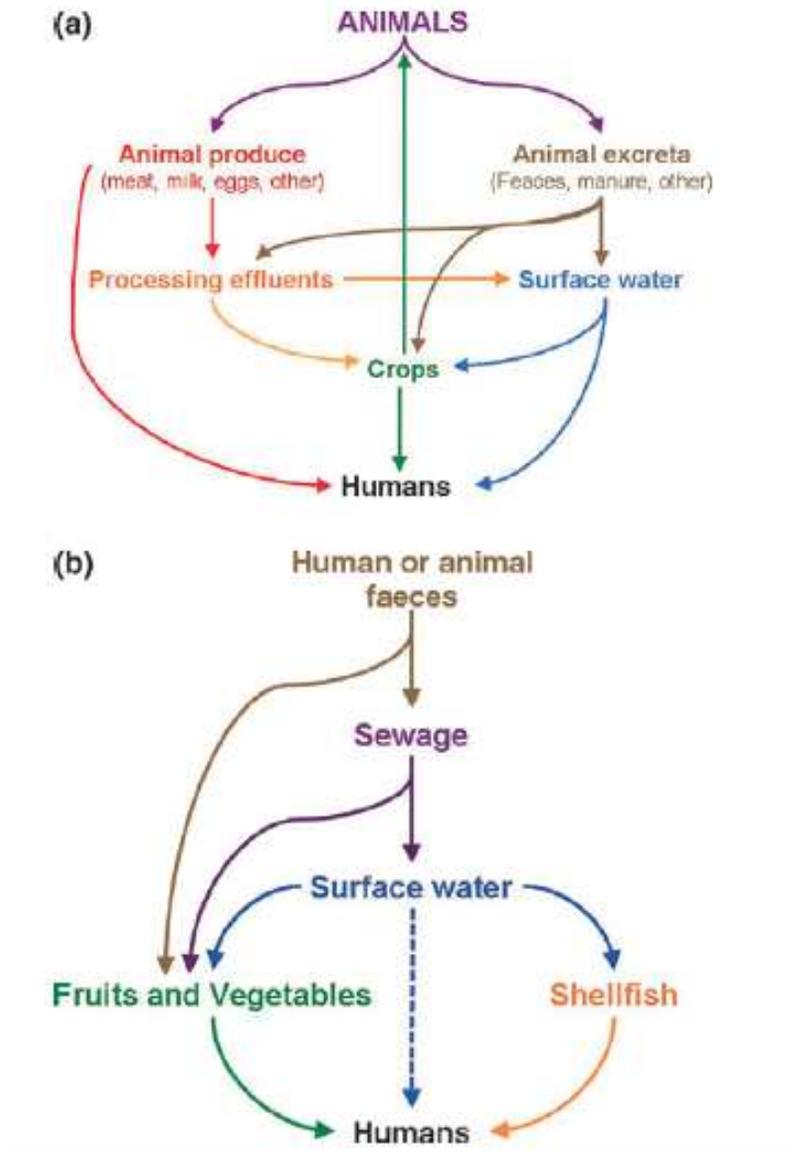


Figura 3: Diferentes rutas de transmisión del HEV. (a) Rutas de contaminación de virus de origen animal. Vía zoonótica de contaminación desde el animal de origen a humanos (b) Contaminación ambiental de virus proveniente de alimentos y agua²⁹.

Por otro lado, las infecciones de origen zoonótico son otra de las fuentes de transmisión más frecuentes del *HEV*, principalmente de *HEV3* y *4*. Se han encontrado rutas de infección provenientes de la ingesta de productos derivados de animales infectados a lo largo del tiempo³⁰(Fig. 3). Varias especies de animales que pueden ser infectadas por *HEV* son capaces de cumplir el rol de reservorio del virus, entre ellas ciervos, cerdos domésticos y jabalíes³¹. El virus presenta cierta estabilidad a temperaturas moderadas a altas, por lo que el consumo de carnes crudas o cocidas al vapor de animales infectados es claramente una vía de contagio³. El contacto directo con animales infectados también ha demostrado ser un factor de riesgo a contraer el patógeno, por lo que las personas laboralmente vinculadas a animales son las más expuestas a una infección por *HEV*²⁵.

Otra de las posibles vías de transmisión del patógeno es la vertical. El virus es comúnmente transmitido de madre a hijo por medio de vías perinatales e intrauterinas³².

También se han hallado evidencias de casos de contagio de *HEV3* por transfusión sanguínea así como por medio de trasplantes de órganos, lo que determina la transmisión parenteral entre seres humanos como otra posible vía de contagio³.

1.6 Estructura y genoma viral

El virus *HEV* posee un virión de cápside icosaédrica, sin envoltura, cuyo tamaño varía entre 27 y 34 nm de diámetro⁶. Su genoma consiste en una sola hebra de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 7.5 kilobases (Kb) que incluye en sus extremos 5' y 3' pequeñas regiones no codificantes (*UTR*), así como una caperuza (*CAP*) y una cola poliadenilada (*Poli-A*), respectivamente. El extremo *CAP5'* es

imprescindible para la infectividad del virus, mientras que el extremo Poli-A 3' contiene elementos involucrados en la regulación de la replicación y la traducción viral¹.

El genoma está dividido en tres marcos abiertos de lectura parcialmente superpuestos: *ORF1*, *ORF2* y *ORF3*³³ (Fig. 4). El *ORF1* se ubica en la región 5' del genoma viral, ocupando dos tercios de la totalidad del mismo. Este marco abierto de lectura codifica para una gran poliproteína de 1.693 aminoácidos, la *proORF1*, que contiene a las proteínas virales no estructurales, responsables de la replicación viral: metiltransferasa, cisteín-proteasa análoga a la papaína, guanililtransferasa, helicasa para ARN y la ARN-polimerasa dependiente de ARN, todas esenciales para la producción de nuevas partículas virales. La región *ORF2*, en la región 3' del genoma viral, codifica la única proteína estructural *proORF2*. El componente de 660 aminoácidos glicosilado en las asparinas 137, 310 y 562, forma la cápside viral que protege al genoma. Ésta se forma mediante complejos de dímeros de *proORF2* que al interactuar con el extremo 5' del genoma viral por su región N-terminal, dan lugar a un multímero muy estructurado (180 moléculas *proORF2* por partícula viral), cumpliendo con funciones esenciales para el ensamblaje del virión y la encapsidación del transcrito genómico³⁴. La proteína *proORF2* contiene 3 dominios lineales: el dominio *S* que forma la estructura interna de la cápside, y los dominios *M* y *P*, involucrados en la interacción virus-célula huésped. El dominio *P* queda expuesto al exterior de la cápside y es el posible sitio de unión de anticuerpos neutralizantes, así como la posible diana de las vacunas que están en desarrollo⁴.

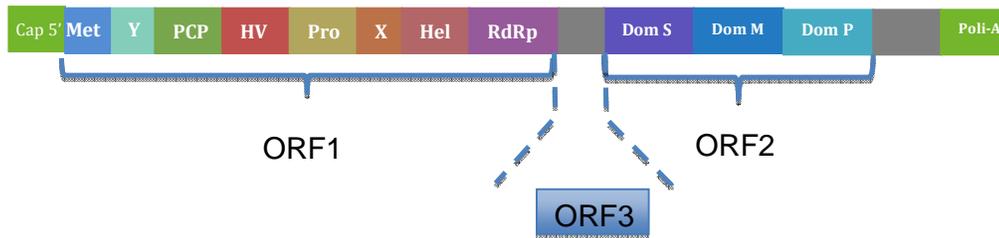


Figura 4: Estructura del genoma de HEV: cadena de ARN de 7,2kb de sentido positivo: residuo 7-metil-guanosina en su extremo 5' (CAP), cola Poli-A en extremo 3, regiones no traducidas 5'UTR y 3'UTR (con fragmentos plegados «tallo-lazo»), los 3 marcos de lectura abierta: *ORF1*, *ORF2* y *ORF3*.

El virus de la Hepatitis E se replica en el citoplasma, donde se traducen las proteínas codificadas por *ORF2* y *ORF3* (solapada con *ORF2*) a partir de un único ARN subgenómico bicistrónico con dos codones AUG localizados en la región central del genoma⁴ y el ARN genómico entero codificando para proteínas no estructurales y cumpliendo con la función de molde para la replicación. Existe información reciente que sugiere que la proteína de *ORF1* no sufre un proceso proteolítico³.

1.7 *ORF3*

La proteína codificada por el marco abierto de lectura más pequeño es traducida del ARN mensajero subgenómico a partir de un tercer codón AUG, casi totalmente solapada con *ORF2*. *ORF3* codifica para una fosfoproteína inmunogénica (pro*ORF3*) de 114 aminoácidos que se asocia con el citoesqueleto celular³⁵. La proteína codificada por *ORF3* interactúa con pro*ORF2*, lo que plantea la posibilidad de un rol regulatorio de *ORF3* en el ensamblaje de la partícula viral³⁶.

La función exacta de esta proteína aún no se ha determinado en profundidad. Se cree que pro*ORF3* interactúa con la fosfatasa quinasa

celular activada por mitógenos y con otras quinasas extracelulares, promoviendo la sobrevivencia de la célula durante la activación de vías de señalización intracelulares^{10, 37}. Se ha sugerido que proORF3 podría cumplir un rol en la regulación dependiente de dimerización en la vía de traducción de señales³⁸.

El producto proteico de este gen es necesario para la infección *in vivo*, probablemente modulando la respuesta del huésped. Se localiza en los endosomas tempranos causando un retraso en el tráfico post-internalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) a endosomas tardíos y lisosomas. Provoca además un enlentecimiento del tráfico y la degradación del c-Met. Estos retardos prolongan la señalización del factor de crecimiento endomembranoso, y promueven la supervivencia celular, contribuyendo a la replicación viral y su patogénesis³⁹.

El tercer marco abierto de lectura del genoma del *HEV* también se ha encontrado localizado en los microtúbulos de las células, interfiriendo con su dinámica. Esto puede sugerir que la interacción de la proteína codificada por *ORF3* con estos polímeros de α y β -tubulina puede facilitar la infección por *HEV*⁴⁰.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo principal de este proyecto es evaluar en forma preliminar el rol de la proteína codificada por el *ORF3* de *HEV* en la proliferación celular y en la protección ante inductores proapoptóticos. Se propone transfectar células de carcinoma pulmonar A549 con un plásmido que incluye el gen reportero de *Green Fluorescent Protein (GFP)* al que se le fusiona la secuencia codificante de *ORF3*, con el fin de obtener una línea establemente transfectada. Para cumplir con este objetivo se establecen las siguientes actividades:

Objetivos específicos

- ✂ Amplificar por PCR y purificar el gen completo que codifica el *ORF3* viral.

- ✂ Clonar el gen *ORF3* en un vector de expresión *pEGFP-C1* empleando enzimas de restricción apropiadas para lograr la integración del inserto en el plásmido en el marco de lectura con la *Green Fluorescent Protein (GFP)*, utilizada como proteína reportera.

- ✂ Desarrollar una línea celular estable, por transfección de la línea A549 que expresen el gen *ORF3* de *HEV*. Generar de la misma manera células control, con el mismo plásmido *pEGFP* sin el inserto *ORF3*.

- ✦ Purificar las células que expresen la proteínas *ORF3-GFP* mediante técnicas de separación celular por citometría de flujo

- ✦ Estudiar el rol de *ORF3* en la proliferación celular mediante conteo celular y métodos colorimétricos (MTT)

- ✦ Evaluar la resistencia a la apoptosis inducida a través del recuento de núcleos

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La Hepatitis E en Uruguay es una enfermedad emergente. De hecho, hasta la fecha se han observado pocos casos de infección por *HEV*, causadas principalmente por el *HEV3*, probablemente de origen zoonótico, y un caso de infección por *HEV1*, como se mencionó anteriormente²³. Debido a la reciente ocurrencia de casos esporádicos, se considera muy importante el comenzar a estudiar los mecanismos implicados en el ciclo viral y la replicación.

La función específica del producto proteico de *ORF3* aún permanece sin ser comprendida. En este proyecto se propone llevar a cabo ensayos que nos permitan obtener evidencias que permitan caracterizar mejor la función de esta proteína, a través de la obtención de una línea establemente transfectada.

Planteamos como hipótesis para este trabajo que pro*ORF3* estimula la proliferación celular, así como también favorece la subsistencia de las células por mecanismos de inhibición de la muerte celular programada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención del *ORF3* de *HEV*

La obtención del gen completo que codifica para la proteína se llevó a cabo a partir de clones plasmídicos que contenían el fragmento de *ORF3* del *HEV*, disponibles en el laboratorio y cedidos por el Dr. Santiago Mirazo. Se lo amplificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo final, con cebadores diseñados a partir de la secuencia nucleotídica de la región de interés, conteniendo sitios de restricción. La secuencia de los cebadores utilizados, 5094-F y 5554-R, sentido y antisentido respectivamente, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores utilizados para la amplificación del gen de interés, *ORF3*

Primer	Secuencia	Target
5554-R	GCGGAGGATCCCCGGTTAGCGGCGCGGCCCCAGCTGTGG	<i>ORF3</i>
5094-F	GTGTCGGGTGCCATGGATAACATGTCTTTTGTGCGCC	<i>ORF3</i>

La PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L conteniendo 34,6 μ L de H₂O ultrapura, 5 μ L de *Buffer Taq10x*, 4 μ L de MgCl₂ 25mM, 1 μ L de *dNTPs*, 1 μ L de cada cebador (5554-R y 5094-F ambos a una concentración de 50mM iniciales) y 0,4 μ L de la enzima *TaqTM DNA Polimerase* (Fermentas, *Life Sciences, Estados Unidos*). Por último, a esta reacción de amplificación se le agregó 3 μ L del ADN plasmídico. El ciclo de amplificación se programó comprendiendo los pasos de

desnaturalización e hibridación, cuya temperatura fue establecida por las temperaturas de *melting* detallada por el fabricante de los cebadores, y la extensión de las nuevas hebras, tal se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Ciclo de amplificación por PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización	95	5	
Desnaturalización	95	1	
Hibridación	55	2	35
Extensión	72	2	
Extensión final	72	10	

El producto amplificado, una vez culminada la PCR, se visualizó mediante corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% con *buffer* Tris-Ácido acético-EDTA (TAE). Éste se preparó agregando 0,8g de *UltraPure™ Agarose* (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos) en polvo a 80mL de *buffer* TAE y calentando brevemente hasta que se disuelve. Luego se agregó a la solución 8µL de *SYBR®Safe DNA Gel stain* (Invitrogen, Estados Unidos), un sensible marcador para la visualización de ADN en geles de agarosa que puede ser revelado fácilmente por excitación con luz UV. De esta manera, empleando un marcador de peso molecular *GeneRuler 50pb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), y conociendo el tamaño del fragmento correspondiente a *ORF3*, (aproximadamente 800pb), se purificó la banda específica al *ORF3*.

La purificación se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el protocolo tal como lo especifica el fabricante del kit *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (ZymoResearch, Estados Unidos). Para confirmar que el ADN presentara buenas relaciones de pureza y en cantidades suficientes para ligar de manera efectiva el fragmento obtenido al plásmido, se

cuantificó el producto purificado por absorbancia a 260nm en el equipo *Nanodrop* (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos).

2.2 Clonado de ORF3 en pEGFP-C1

Para clonar el gen codificante del *ORF3* se seleccionó como vector el plásmido *pEGFP-C1* (Fig. 5), dado que permite la expresión en células de origen mamífero. El plásmido a su vez, codifica el gen de la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, *GFP*), que permite expresar en marco de lectura y como una proteína de fusión, al gen exógeno.

Para clonar el fragmento de *ORF3* utilizando el vector de expresión, se utilizó el fragmento obtenido de la purificación de la banda del gel correspondiente al producto de la PCR de los clones. Con este objetivo, se digirió el vector *pEGFP-C1* circular con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* (*Life Technologies*, Estados Unidos), obteniendo como producto el plásmido lineal.

Para clonar el gen de *ORF3* en el vector plasmídico, se realizó la ligación en un volumen final de 19 μ L agregándose, en un primer paso llevando a cabo un subclonado en el plásmido pJET, siguiendo los pasos detallados por el fabricante del CloneJET PCR Cloning Kit (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos). Una vez obtenido el subclonado en el pJET, se liga al plásmido *pEGFP-C1* lineal incubando la mezcla con 1 μ L de enzima ligasa T4 (*Fermentas*, *Thermo Scientific*, Estados Unidos) 20 minutos a temperatura ambiente.

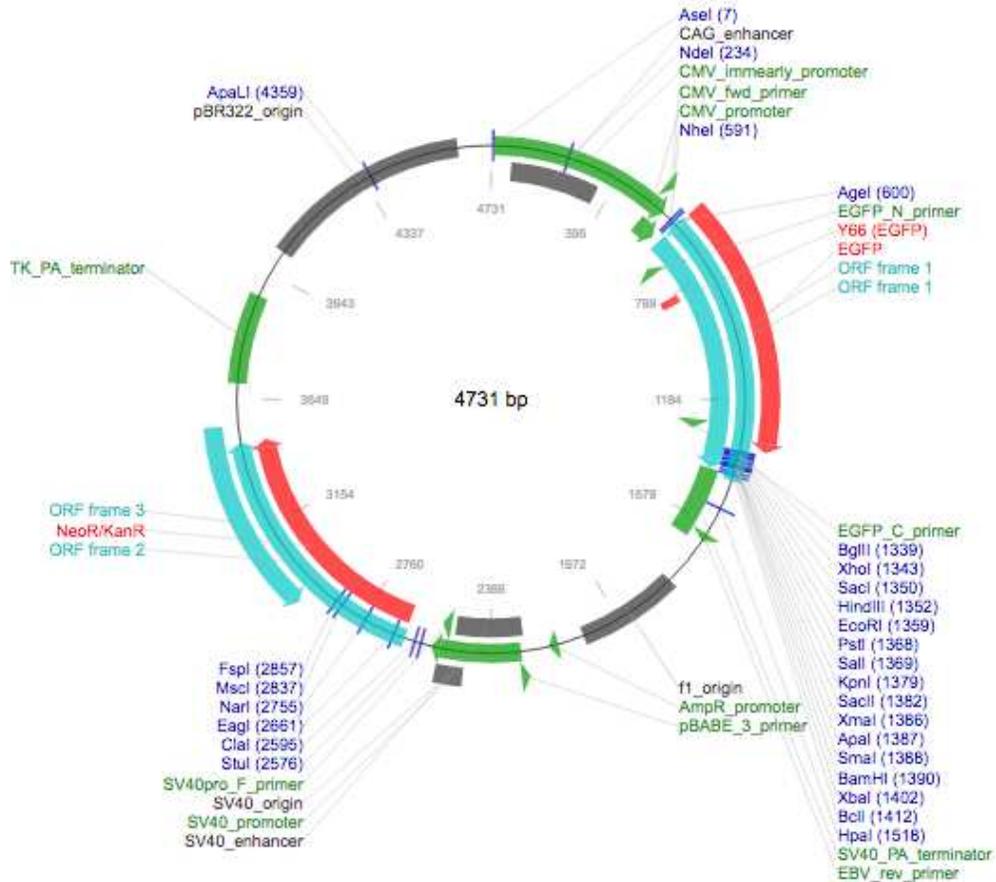


Figura 5: Vector de expresión pEGFP-C1 de Addgene (Estados Unidos). Las inscripciones corresponden a los genes incluidos y sus sitios de corte⁴¹.

Una vez completado el procedimiento de ligación del inserto con el vector, se procedió con la transformación de células bacterianas competentes de *Escherichia Coli* Dh5 α (*New England Biolabs*, Estados Unidos) con el producto de ligación mediante *shock* térmico. Para esto se mezclaron 5 μ L del producto de ligación con 30 μ L de bacterias *E. Coli* en un microtubo y se lo colocó en hielo durante 30 minutos. Luego se colocó la mezcla en un baño de maría a 42 $^{\circ}$ C durante 45 minutos, y nuevamente en hielo por 5 minutos. Se adicionó a la mezcla anterior 300 μ L de Medio de cultivo Luria Bertani (LB) y se dejó 1 hora a 37 $^{\circ}$ C en agitación a 220 r.p.m. En placas preparadas de LB Agar se sembraron con rastrillo 150 μ L de células

transformadas a distintas concentraciones (sin diluir y 1:10). Se dejaron incubando en estufa a 37°C durante 24 horas para obtener las colonias. Las colonias obtenidas fueron crecidas en LB líquido con el antibiótico Kanamicina (50µg/ml) durante otro día más a 37°C en agitación a 220 r.p.m.

Las colonias resistentes fueron sometidas a una extracción de material genético plasmídico contenido en la bacteria, que expresa el gen de interés. Este paso se realizó con el kit comercial *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (*Thermo Scientific*, Estados Unidos). Se llevó a cabo una PCR convencional de las muestras que supuestamente incluían el inserto de interés empleando los cebadores diseñados para *ORF3* con el fin de corroborar la presencia del gen. El producto de *pEGFP-C1* con *ORF3* como inserto se cuantificó al igual que se hizo al purificar las bandas obtenidas a partir de los clones. Se requiere una cantidad mínima de ADN para poder transfectar células eucariotas de aproximadamente 5µg (250µg/µL) con una relación de pureza 260/280 de entre 1,8 y 2.

2.3 Células y condiciones de cultivo

Para llevar a cabo la transfección del plásmido conteniendo el gen completo *ORF3* se utilizó la línea celular A549 (ATCC[®] CCL-185[™], Estados Unidos). Las células se crecieron en medio *GMEM* (*Life Technologies*, Estados Unidos) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (*Life Technologies*, Estados Unidos), glutamina y antibiótico-antimicótico 1%, a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂.

2.4 Transfección de células

La transfección estable de una línea celular se obtiene cuando un vector introducido en la célula eucariota se integra al genoma del huésped por medio de las enzimas que reparan y recombinan al ADN, alterándolo de forma irreversible⁴² (Fig. 6).

Se plaquearon 800.000 células A549 y se dejaron crecer durante 18hs en placas de 60mm hasta alcanzar la confluencia. La inclusión del plásmido a las células eucariotas se llevó a cabo mediante el Kit comercial *Lipofectamine® LTX with Plus™ Reagent* (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos). Se procedió incubando durante 5 minutos el reactivo *Plus* incluido en el Kit con medio *OptiMEM* (Life Technologies, Estados Unidos) y 2,5µg de ADN, para luego incubar con *Lipofectamine®* durante 20 minutos e incorporar la mezcla a los pocillos donde se encuentran las células a transfectar (Fig. 6). Este protocolo se llevó a cabo tanto con el plásmido codificando el *ORF3* como con el control *pEGFP-C1* sin inserto.

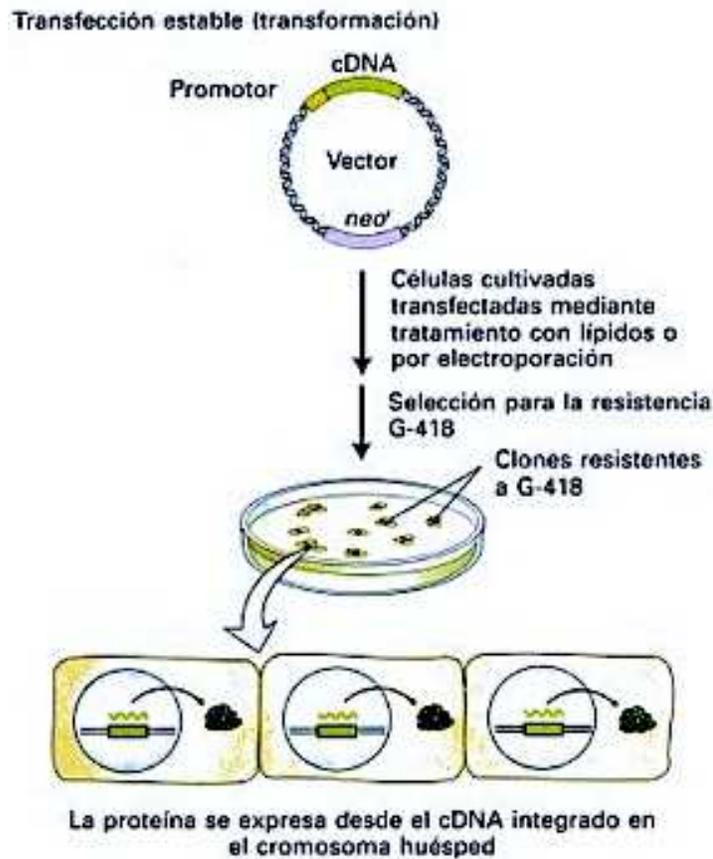


Figura 6. La transfección estable con plásmidos permite la expresión de genes clonados en células animales cultivadas. Las pocas células eucariotas transfectadas que integran el genoma foráneo a su ADN son seleccionadas en un medio con el antibiótico Geneticina (G-418). La proteína de interés se produce mientras se mantenga integrada en el genoma celular.⁴³

Para favorecer la obtención de células establemente transfectadas, es necesario que los vectores de expresión contengan un marcador de selección, es decir un gen que permita diferenciar las células que incorporaron el plásmido efectivamente de aquellas que no lo hicieron (Fig. 6). El gen neomicina fosfotransferasa (*Neo*) le otorga resistencia a la célula frente a la Geneticina (G-418).¹⁸ Este compuesto tóxico para las

células normales es un aminoglicósido relacionado con la Gentamicina que funciona como agente selectivo de células eucariotas. G-418 interfiere con la síntesis proteica, actuando sobre el ribosoma 80S. El gen de resistencia *NeoR* está incluido en el vector de expresión utilizado para clonar *ORF3* (Fig. 5). La selección fue progresiva, ya que una incorporación tan drástica de cualquier antibiótico a un cultivo podría perjudicar a las células. Inicialmente se agregó 25µg/ml de geneticina, a las 48 horas se le cambió el medio esta vez agregando a cada pocillo 50µg/ml y finalmente, 48 horas después, se volvió a cambiar el medio de cultivo duplicando la cantidad de antibiótico al doble (100µg/mL). Esta concentración de G-418 se mantuvo en todos los ensayos posteriores en los pocillos que incluían las células transfectadas.

Para evaluar cualitativamente la eficiencia de transfección se observaron las células eventualmente transfectadas bajo microscopio de epifluorescencia con filtro de 395nm. Este procedimiento permitió evaluar el porcentaje aproximado de células que incorporaron el plásmido, al verificar la expresión de la proteína GFP, codificada en marco de lectura con el gen de interés.

2.5 Citometría de Flujo

Con el objetivo de purificar las células transfectadas que expresaron GFP y *ORF3*, se realizó una metodología denominada *Single Cell Deposition*. Este sistema disponible en el Servicio de Citometría de Flujo del *Institut Pasteur* de Montevideo, utiliza una plataforma que permite seleccionar las células que expresen *GFP*. Para llevar a cabo este procedimiento se despegaron las células del fondo de la botella con tripsina, se traspasó el contenido neutralizado a tubos falcon y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500r.p.m. Luego de descartado el sobrenadante, se agregó 1mL de medio *GMEM* 10% sin antibiótico para después filtrarlo por

un tubo con membrana de un tamaño de poro igual a 35µm. Tres placas de 96 pocillos se prepararon con 100uL de *GMEM* 20% en cada pozo donde luego se depositaron las células transfectadas. Controles de células sin transfectar, es decir *A549 wild type* fueron necesarios para establecer la diferencia entre aquellas que incorporaron exitosamente el vector de las que no. Se seleccionaron solo aquellas células que expresaban el plásmido, evaluado a través de la detección de *GFP*. El citómetro de flujo tiene la capacidad de separar la células que expresan la proteína marcadora *GFP* de aquellas que no presentan emisión de fluorescencia verde. Para esto, antes de pasar por el equipo las células transfectadas, se debe presentar las células *wild type* para establecer el control negativo. A partir de esto se eligen, para las células que sí fueron transfectadas, las células que expresan más proteína verde fluorescente. Este método permitió depositar una célula en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y el procedimiento se realizó tanto para las muestras transfectadas con el plásmido incluyendo el inserto *ORF3* como para aquellas a las que se les incorporó el plásmido *pEGFP* control. Para impedir el crecimiento de células que se hubieran depositado y que no expresaran el plásmido, al medio de cultivo se le agregó el agente de selección Geneticina.

Una vez lograda la confluencia celular en algunos de los pocillos sembrados, las células se observaron nuevamente en el microscopio de epifluorescencia excitándolas a 495nm. Teniendo en cuenta el ruido de fondo por el material del recipiente (*background*), las células que aparecieron verdes fluorescentes son las que estaban expresando *GFP*, y por ende incluyeron el plásmido *pEGFP-ORF3*. Se repitió varias veces el procedimiento de *Single Cell Deposition* de las células que surgieron a partir de las anteriormente purificadas por el citómetro de flujo para filtrar nuevamente solo aquellas células que expresaran la proteína reportera, de manera de obtener finalmente líneas celulares puras.

2.6 Evaluación de la proliferación celular por recuento

Las células obtenidas producto de la transfección se sembraron en una placa de 24 pocillos para continuar con los experimentos de proliferación. Para el ensayo de conteo se sembraron doce pozos con 20.000 células cada uno en dos placas: en una de ellas las células obtenidas de la transfección estable con el plásmido conteniendo el gen *ORF3* ligado, mientras que en la otra se sembraron las transfectadas con el vector *pEGFP* solo, a modo de control del efecto de la proteína en la proliferación de las células A549. Se dejaron crecer las células durante 24 horas y se comenzó con el conteo. Durante los siguientes cuatro días las células se fueron contando, de a tres pocillos por día (por triplicado). Se neutralizó el efecto de la Tripsina con medio para luego contarlas empleando la cámara de Neubauer.

Con los resultados obtenidos a lo largo de los días se graficó el número de células totales en función de los días.

2.7 Evaluación de la proliferación celular mediante ensayo de MTT

El ensayo de sales de tetrazolio es reconocido como un sistema de medida indirecta de masa celular. Éste mide la función metabólica de las células usando la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)⁴³.

Se sembró, en una placa de 96 pocillos, cinco pocillos con 10.000 células para cada línea celular (la línea transfectada con el plásmido incluyendo *ORF3*, la que fue transfectada solo con el plásmido y la línea celular *wild type* y otros cinco pocillos de cada muestra conteniendo 20.000 células cada uno. A estos se los dejó crecer durante cuatro días y se le quitó el medio en el que estaban. Luego se le agregó 10µL de MTT 5mg/ml en PBS a cada pocillo y se incubó la placa en la estufa a 37°C durante 3

horas. 200µL de SDS 10% a pH1 se agregaron a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas. En este paso es esencial que la placa quede en oscuridad durante el período de incubación.

La placa fue leída en un espectrofotómetro y se midió la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 570nm. Los resultados para los quintuplicados fueron promediados.

2.8 Análisis de la apoptosis celular mediante tinción con DAPI por evaluación morfológica del núcleo y conteo de núcleos

La muerte celular programada puede ser evaluada mediante el empleo de técnicas de tinción nuclear, entre ellas el uso de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Esta aproximación permitió obtener una visualización clara de los núcleos celulares facilitando la interpretación del estado de los núcleos. DAPI se asocia al surco menor de la doble hebra de ADN y la unión a agrupaciones de adeninas y timinas se ve favorecida, logrando una emisión de fluorescencia azul⁴⁴.

En una placa de 24 pocillos se sembraron 50.000 células de cada una de las líneas celulares, la línea transfectada con el plásmido incluyendo *ORF3*, la que fue transfectada solo con el plásmido y la línea celular *wild type*, en cuatro pocillos. Se dejaron crecer en medio complementado con 10% de SFB durante 24 horas en estufa de CO₂ a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavaron las células con PBS, se fijaron con etanol durante 10 minutos para luego ser tratadas con DAPI, ya que para que el compuesto fluorescente pueda ingresar a las células y unirse al ADN, éstas deben estar permeabilizadas y fijadas.

Simultáneamente a la placa detallada en el párrafo anterior, se sembró otra placa de 24, de los cuales a ocho pocillos se le añadieron 50.000

células transfectadas con el plásmido que incluye el gen *pEGFP-ORF3* y a otros ocho se le agregó la misma cantidad de células pero de las que se les integró el vector *pEGFP* sin el inserto. A las células de esta placa también se las dejó crecer 24 horas, pero esta vez se le indujo la apoptosis mediante la incorporación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al medio, ya que al aumentar el estrés oxidativo intrínseco se estimula la muerte celular programada⁴⁵. Tres de los pozos de cada línea celular se trataron con el agente oxidante, de manera tal de obtener una concentración final igual a 2mM, mientras que para los otros tres se buscó exponer a las células a 10mM final de H_2O_2 . A los dos pozos restantes de cada muestra, no se les promovió el proceso de apoptosis, de manera de tener un control del tratamiento. La placa se incubó durante tres horas luego de incorporado el H_2O_2 . Una vez finalizado el tiempo se fijaron las células con etanol como se describió anteriormente. Después se lavó con PBS y se le agregó el compuesto DAPI incubando las muestras con el mismo durante 5 minutos en absoluta oscuridad. Lavados con PBS fueron necesarios concluido este paso.

Ambas placas se observaron luego bajo el microscopio de epifluorescencia, para evaluar el estado de los núcleos celulares. Se comparó la placa inducida con la que no se provocó la muerte celular, y luego se contrastó entre ambas líneas celulares y sus controles.

2.9 Análisis de la resistencia la apoptosis mediante recuento celular

Para esta técnica se procedió con la inducción de la apoptosis de la misma manera que para aquellas células teñidas con DAPI. Se sembraron 50.000 células por pocillo de la línea de *A549 wild type* y otros con células transfectadas con *pEGFP-ORF3*. Se crecieron en estufa durante 24 horas a 37°C con medio *GMEM* 10%. Transcurrido este tiempo se le agregó a tres pozos de cada muestra 10mM de H_2O_2 y se

dejó incubar durante 3 horas. Para cada línea celular se realizó un control de células sin tratar.

Al igual que el ensayo de recuento celular para la evaluación de la proliferación, se procedió a contar las células empleando la cámara de Neubauer con el fin de analizar la cantidad de células sobrevivientes al tratamiento para las células transfectadas incluyendo el gen de interés, como para aquellas utilizadas como control (las células *wild type* y las que contenían *pEGFP*).

3. RESULTADOS

3.1 Obtención del plásmido *pEGFP* con el gen *ORF3* del *HEV*

Como se mencionó en la sección materiales y métodos, para obtener el fragmento *ORF3* se partió de diferentes clones a partir de los cuales se amplificó por PCR. Un fragmento de 800pb fue amplificado satisfactoriamente (producto 531) (Fig. 7).

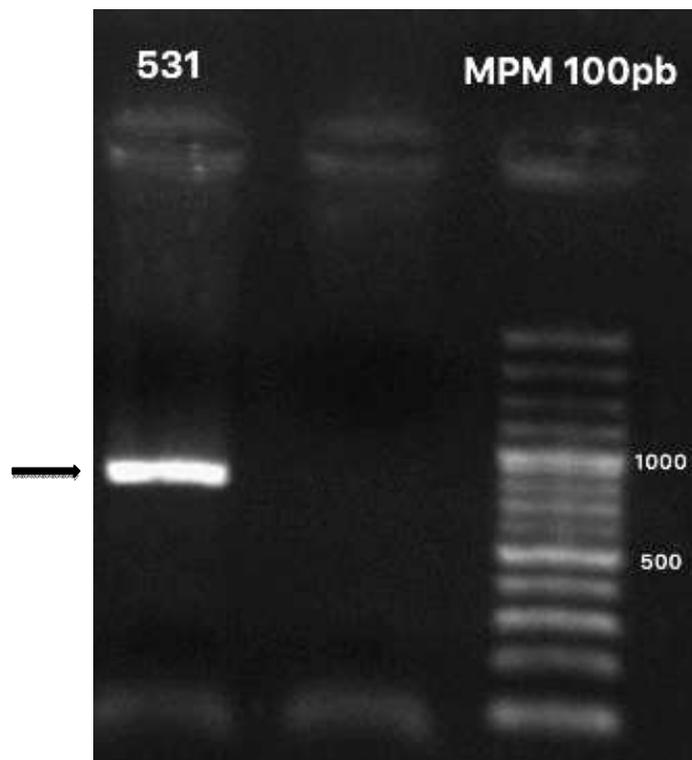


Figura 7: PCR de *ORF3*. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % en el que se corrieron los productos amplificados con los cebadores específicos para *ORF3*, 5554-R y 5094-F. La flecha indica la banda correspondiente al gen codificante del *ORF3*.

La banda de 800pb obtenida se purificó según el kit descrito en materiales y métodos. Luego de la purificación con el kit comercial se cuantificó la muestra: se consiguió 3,1ng/μL de ácido nucleico con una relación 260/280nm igual a 1,9.

Luego del clonado, se extrajo el ADN plasmídico de 4 colonias y se cuantificaron las muestras. Los datos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Cuantificación por Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific*, Estados Unidos) del material genético obtenido a partir de la extracción por MiniPrep.

Plásmido-ORF3	Concentración (ng/μL)	260/280 (nm)
TUBO 1	232,2	1,89
TUBO 2	325,9	1,87
TUBO 3	368,2	1,87
TUBO 4	400,8	1,89

3.2 Transfección de células

El objetivo en este punto era lograr tener una línea celular homogénea donde todas las células hubieran incorporado el plásmido durante la transfección. Para esto se procedió con la deposición de una célula por pocillo en una placa de 96 pocillos con el fin de que todos los clones generados a partir de esa célula tuvieran inserto el plásmido.

A modo de referencia para poder seleccionar las células que realmente interesaban en la investigación, se pasaron por el citómetro de flujo células *wild type* sin transfectar para establecerlas como negativas para la expresión de *GFP* (Fig. 8).

A partir del control establecido se pudo diferenciar las células positivas (expresan *GFP*) de las negativas, seleccionando las positivas para depositar. Además de la deposición de células singulares se situaron, en los últimos dos pocillos de la placa, cien células en cada uno.

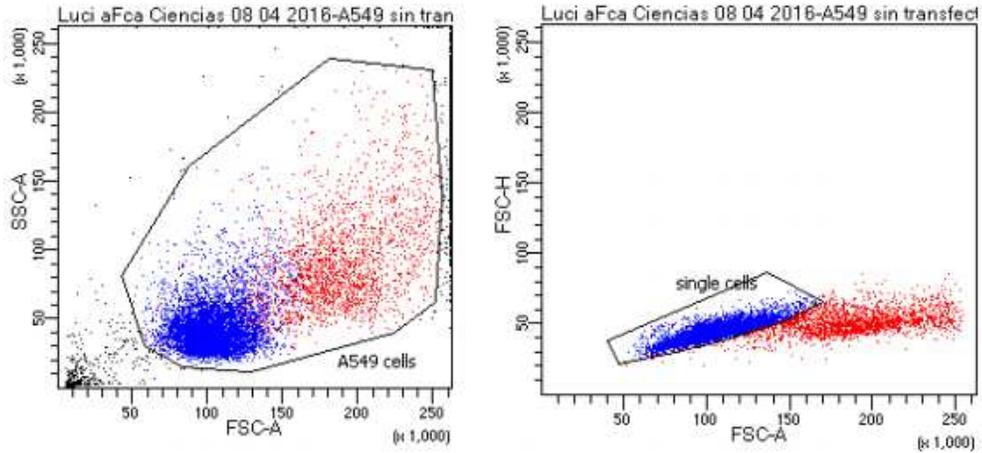


Figura 8: Dotplots generados por el citómetro de flujo de las células A549 *wild type*. Cada punto que se muestra en estas imágenes es un evento independiente, una única célula (*Single Cell*). Las células que se observan de color azul corresponden a las que no expresan la proteína verde *GFP*, mientras que las rojas son las células positivas para este marcador fluorescente.

Las células colocadas, positivas para la expresión de la proteína verde fluorescente, y por ende del gen *ORF3*, dieron lugar a colonias que se volvieron a purificar mediante citometría de flujo varias veces para obtener una cepa totalmente pura. Las células resultantes se mantuvieron para poder llevar a cabo los ensayos de evaluación de la función de la proteína codificada por *ORF3*(Fig.9)

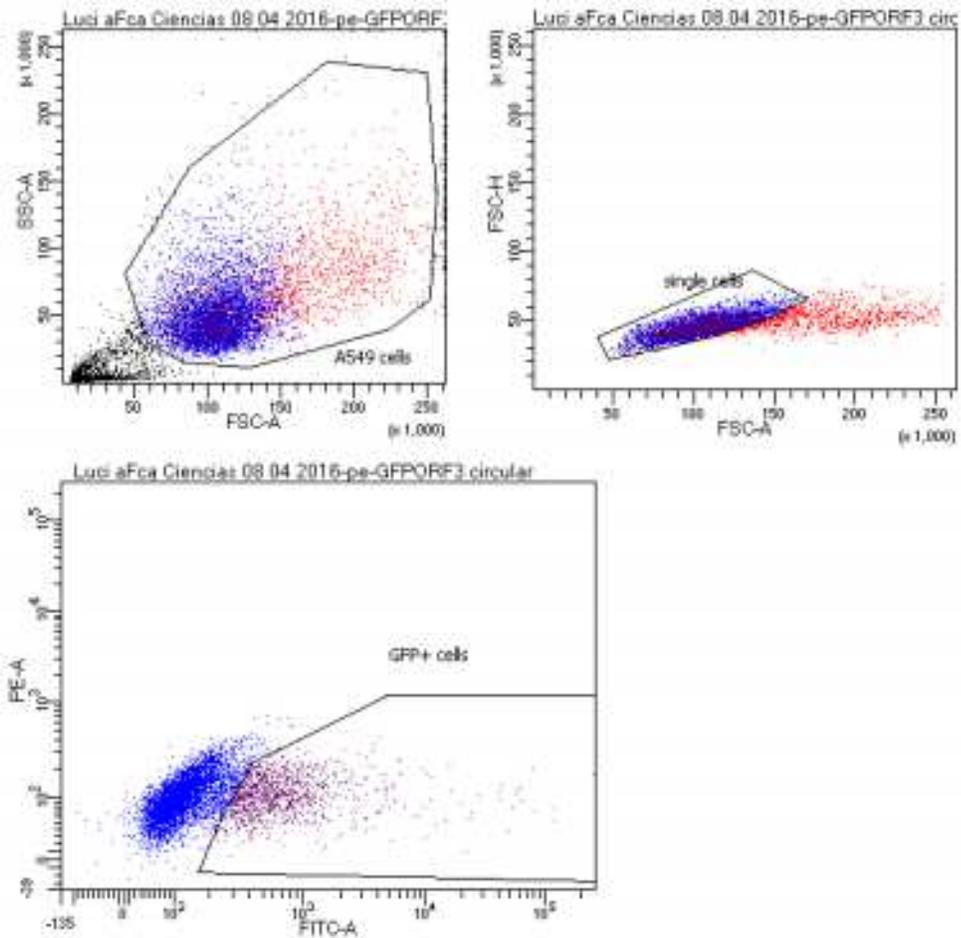


Figura 9: Dotplots de las células transfectadas con *pEGFP-ORF3*. El cuadro de arriba a la izquierda muestra el total de eventos. El de arriba a la derecha toma en cuenta las células individuales. En el recuadro de abajo se seleccionaron las células que más intensamente expresaron *GFP*.

Además de las células que incluían en inserto *ORF3*, se realizó una cepa en paralelo que contenía el plásmido sin el gen foráneo de interés. Estas células también fueron sometidas al proceso de *sorting* con la finalidad de tenerlas como control y poder adjudicar los resultados con confianza a la proteína de *ORF3*. Además de asegurarnos de que no exista la posibilidad de que sea una efecto transmitido por la expresión del plásmido (Fig. 10).

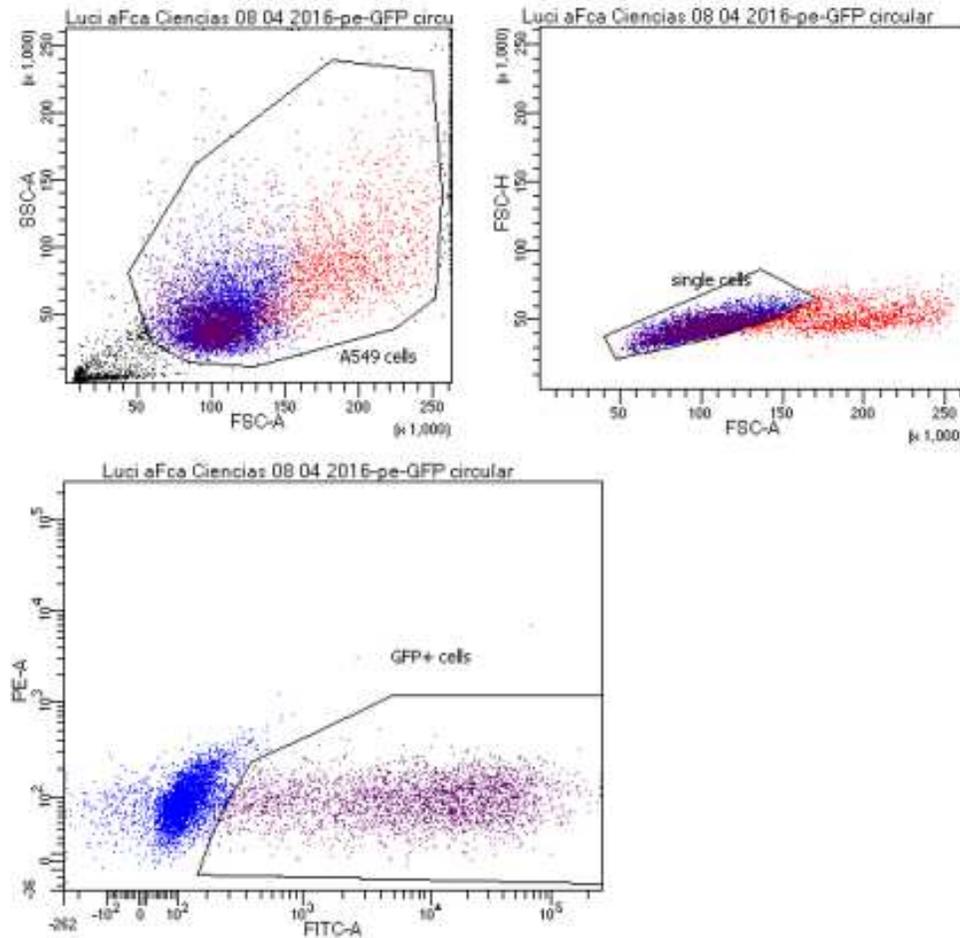


Figura 10: Dotplots obtenidos al pasar la muestra con células transfectadas con *pEGFP*. A partir de éstos, y seleccionando como se hizo anteriormente, solo las que más expresan el gen *GFP* se depositaron células de a una por pocillo.

Las células A549 transfectadas con *pEGFP* sin el inserto de interés no lograron proliferar, a pesar de los seis intentos en los que se llevó a cabo

la deposición de células singulares con el fin de obtener clones. Algunas pocas células se mantenían vivas a lo largo del tiempo, pero sin lograr la reproducción. No se obtuvo la cantidad mínima de células necesaria para utilizarlas como control en los ensayos.

3.3 Evaluación de la proliferación por recuento celular

Este ensayo se llevó a cabo mediante el empleo de la cámara de Neubauer como se describió en la sección Materiales y Métodos. Las células fueron contadas por triplicado y periódicamente, de manera de obtener resultados cada 24 horas en los cuatro días sucesivos a la siembra inicial. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 11.

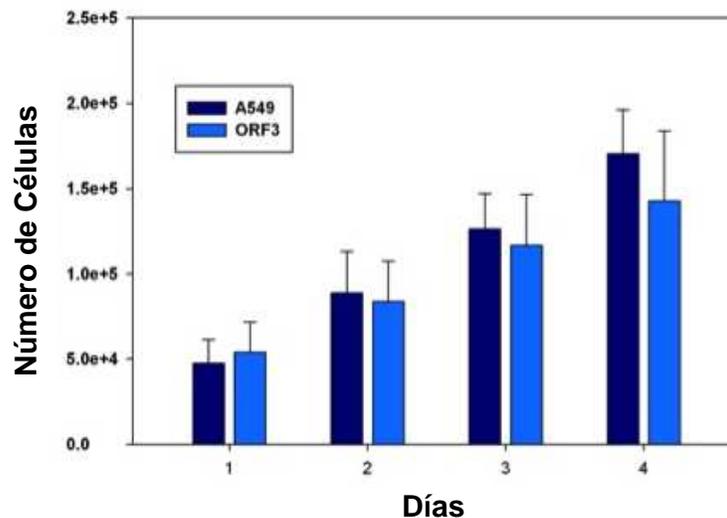


Figura 11. Análisis de la evaluación de la proliferación celular mediante conteo en cámara de Neubauer. Se representó el número de células por mL hallado en función de los días, incluyendo el desvío estándar.

En esta representación se observa que, partiendo de la siembra de la misma cantidad de células para ambas líneas, no existen grandes

diferencias en la eficiencia de la proliferación celular. Al interpretar las barras obtenidas, se puede observar que la diferencia entre el número de células registrado día a día entre las dos cepas celulares es menor al error introducido por el desvío estándar.

3.4 Evaluación de la proliferación celular a través del ensayo de MTT

El experimento que consistió en la incubación de una cantidad específica inicial de células con sales de tetrazolio, dio lugar a pocillos de color amarillo que luego se midieron por espectrofotometría para medir la proliferación (como se explica detalladamente en la sección Materiales y Métodos). Las medidas obtenidas se promediaron y se halló el desvío estándar para cada muestra con el fin de obtener los datos que se muestran en la Figura 12.

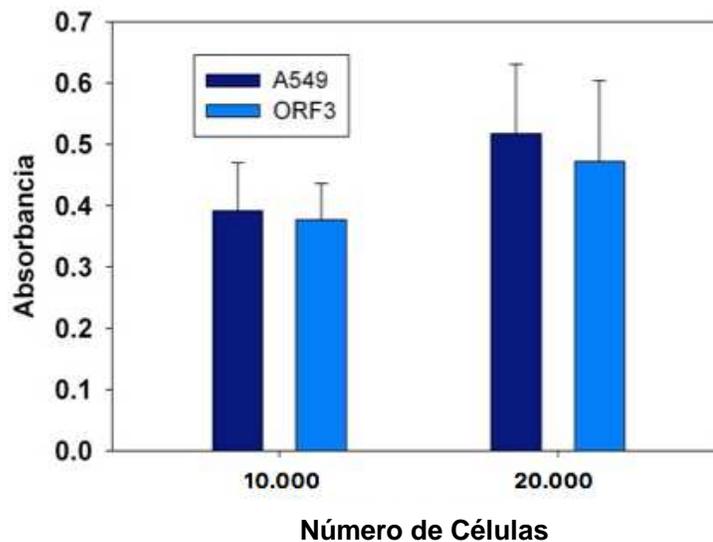


Figura 12. Resultado del ensayo con sales de tetrazolio (MTT). Se evaluó la proliferación celular de las distintas líneas celulares. Se graficó la absorbancia obtenida intrínsecamente relacionada con la proliferación en función de la cantidad de células sembradas originalmente en el día inicial.

Al igual que se observó en el ensayo de conteo, se pudo ver que no existieron diferencias significativas entre la proliferación de las células transfectadas con *pEGFP-ORF3* de la de las células *wild type* A549. Nuevamente el error implantado por el desvío estándar es mayor a la diferencia observada entre los ensayos.

3.5 Evaluación de células apoptóticas por tinción con DAPI por evaluación morfológica del núcleo y conteo de núcleos

La tinción con DAPI es una técnica empleada para evaluar el estado de los núcleos celulares. Se analizó la morfología de los núcleos con el objetivo de evaluar su integridad, como es esperable en una célula sana, o, si de lo contrario, se ven granulados como es característico de las apoptóticas. Los pocillos conteniendo células fijadas y luego tratadas con DAPI, se observaron en el microscopio de epifluorescencia. Se analizaron las células a las cuales no se les indujo la muerte celular programada para evaluar, cualitativamente, si muchas de las células sufrían este proceso. Tanto para las A549 *wild type* como para las células transfectadas, la tasa de apoptosis era menor en las células no tratadas pero no se observaron diferencias claras en el número de células entre ambas líneas.

Se diseñó un ensayo de apoptosis para evaluar si la proteína proORF3 cumplía con alguna función implicada en la muerte celular programada. El proceso de apoptosis debió inducirse para poder evaluar si la proteína codificada por el ORF3 de HEV cumplía alguna función frente a este proceso, y en caso de ser así, si estaba encargada de promoverla o inhibirla. Fue así que se decidió inducir la muerte celular mediante la adición de distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno a 2mM y 10mM final, dejando células sin tratar como control. Tras la incubación

con el agente oxidante si fijaron, y semarcaron con DAPI para observar en el microscopio bajo luz UV (Fig. 13).

Se observaron las células (las transfectadas así como las *wild type*) tratadas con una menor concentración de peróxido y luego aquellas que habían sido expuestas a una mayor cantidad para poder compararlas. Luego se comparó entre las distintas líneas celulares para poder evaluar el probable rol cumple la proteína en estudio en este aspecto.

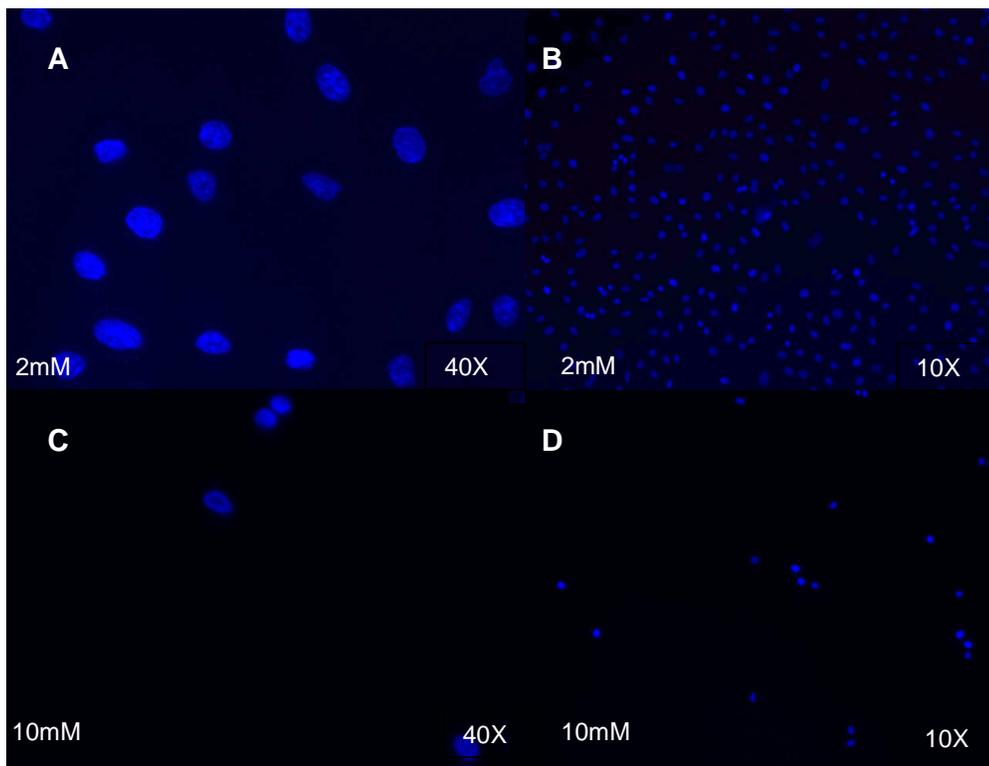


Figura 13: Ensayo de inducción de apoptosis en células A549 *wild type*. Fueron tratados con DAPI y observadas en microscopio de epifluorescencia. A) Células fijadas una vez incubadas con peróxido de hidrógeno 2mM. Visualizadas con un aumento 40X. B) Células a las que se les agregó peróxido de hidrógeno 2mM. Se vieron con un objetivo de aumento 10X. C) Células tratadas con el agente inductor a una concentración final igual a 10mM. Observadas a 40X. D) Células a las que se le adicionó peróxido de hidrógeno 10mM final. Se las visualizó a un aumento 10X.

En los pocillos en los que fueron sembradas las células *wild type* presentaron mucho menor cantidad de células las que se trataron con menor concentración de H_2O_2 que aquellas a las que se les incorporó una concentración de 10mM de H_2O_2 (Fig. 13 A y B vs. C y D). Al comparar este resultado con el control negativo (células a las que no se les indujo la apoptosis), se pudo observar una cantidad de células significativamente mayor que en lo pocillos que se les añadió H_2O_2 . A mayor cantidad de H_2O_2 , mayor tasa de apoptosis. Cuando se observaron las células más en detalle se pudieron hallar algunas células con signos apoptóticos (núcleos granulados).

Tanto para las células que incorporaron el plásmido *pEGFP* con el gen *ORF3* como para las células A549 *wild type*, se observó que a mayor concentración de H_2O_2 incorporado, menor era la cantidad de células en el pocillo. La inducción de la apoptosis en células transfectadas con el plásmido *pEGFP* incluyendo la proteína pro*ORF3* no fue tan eficiente como en el caso de la línea celular *wild type* (Fig.14).

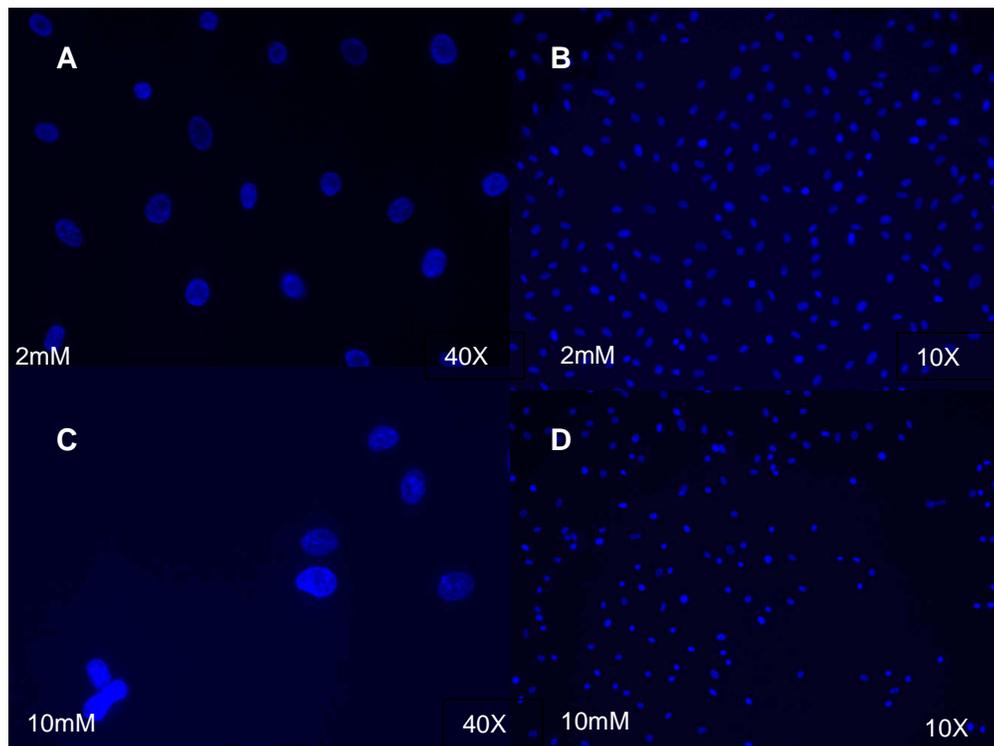


Figura 14: Células A549 transfectadas con *pEGFP-ORF3* sometidas a inducción de la muerte celular programada. Fueron marcadas con DAPI y observadas en microscopio de epifluorescencia. A) Células tratadas con peróxido de hidrógeno 2mM. Visualizadas con un aumento 40X. B) Células a las que se les incorporó peróxido de hidrógeno 2mM. Se vieron con un aumento 10X. C) Células tratadas con el agente oxidante a una concentración final igual a 10mM. Observadas a 40X. D) Células a las que se le agregó peróxido de hidrógeno 10mM final. Se las visualizó a un aumento 10X.

En los pozos de la placa correspondientes a A549, a pesar de no observar demasiadas células que indicaran signos apoptóticos (algunas sí manifestaron un claro signo como la presencia de núcleos granulados, como muestra la Figura 14A), se vieron mucho menor cantidad de células en éstos, que en los que fueron sembrados con las células transfectadas. Aun así las células del control negativo, las que no fueron tratadas, se

vieron en mayor cantidad que las tratadas de cualquiera de las dos líneas. A su vez, las células sometidas a una concentración más elevada del agente inductor, mostraron menos células que aquellas a las que se les agregó una menor concentración de peróxido (2mM), independientemente de la línea celular. La línea celular transfectada mostró una mayor resistencia a la inducción de la muerte que la línea *wild type*. Se compararon las distintas líneas bajo el mismo tratamiento y se vieron más células en los pocillos que contenían las que incorporaron *ORF3* que los que poseían las células sin transfectar.

3.6 Evaluación de la resistencia a la apoptosis mediante recuento celular

Otro de los métodos utilizados para el análisis de la función de la proteína generada por el *ORF3* del genoma viral, fue el de recuento de células una vez inducida la muerte por medio del empleo de H_2O_2 , al igual que se hizo anteriormente con las células tratadas con DAPI. A las células se les agregó H_2O_2 de manera de obtener una concentración final igual a 10mM. Esta vez, en lugar de ser fijadas con etanol absoluto, las células se despegaron de la placa con tripsina y se sembraron en la cámara de Neubauer para ser contadas bajo microscopio óptico invertido.

Como se puede observar en la Fig. 15, los pocillos sin tratar con H_2O_2 no presentaron diferencias significativas en el número de células.

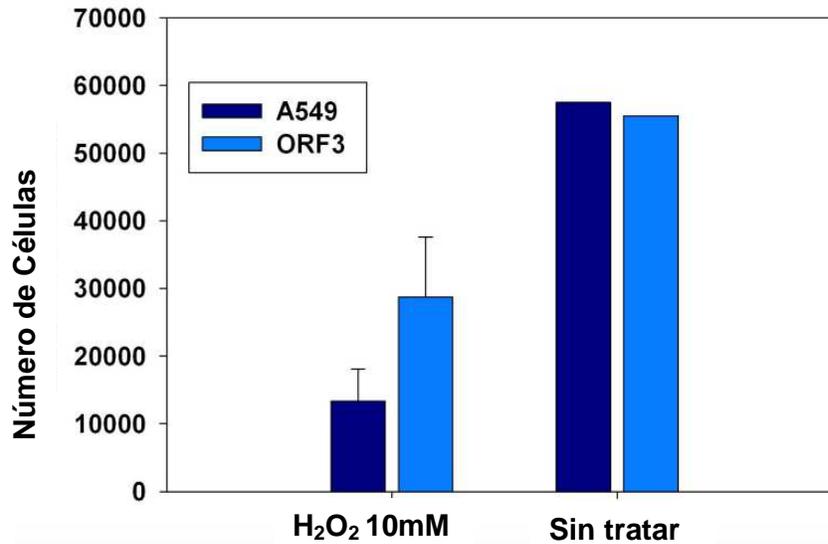


Figura 16: Resultados del ensayo de apoptosis mediante recuento de células. Se contaron las células de ambas líneas celulares que habían sido incubadas con peróxido de hidrógeno y aquellas a las que no se las había sometido a ningún agente para provocar la muerte celular.

Por otra parte, la diferencia entre la cantidad de células a las que sí se le agregó H₂O₂ entre las distintas líneas celulares varió sustancialmente. Los pocillos que contienen las A549 *wild type* presentan en promedio menos de la mitad de células que aquellos que contenían las células transfectadas con el plásmido con *ORF3* incorporado.

DISCUSIÓN

La Hepatitis E es una enfermedad emergente en Uruguay, así como en muchos otros países²³. Un alto número de personas mueren anualmente debido a un cuadro agudo de hepatitis causado por la infección por *HEV*⁶. Los países en desarrollo son muy afectados debido al acceso diario a aguas contaminadas, así como muchas otras regiones del mundo son susceptibles al contagio mediante el consumo o el contacto con animales infectados⁴. Los casos de Hepatitis E en regiones no endémicas, aunque esporádicos, han aumentado en frecuencia en los últimos años⁸.

La función exacta de la proteína generada por el *ORF3* es aún desconocida. Varios estudios han sugerido que *proORF3* puede interactuar con fosfatasa quinasas celulares promoviendo la sobrevivencia de la célula durante la activación de vías de señalización intracelulares^{10,40}, así como también puede estar involucrada en la infección *in vivo* mediante la modulación de la respuesta del huésped. Se cree que puede promover la supervivencia celular, contribuyendo a la replicación viral y su patogénesis.³⁸

En este trabajo se buscó evaluar los posibles roles de la proteína *proORF3* del *HEV* en la proliferación celular e inhibición de la apoptosis.

Luego de la amplificación mediante PCR del plásmido con el inserto clonado utilizando los cebadores diseñados para hibridar el gen, se realizó una electroforesis en gel de agarosa en la que se obtuvo una banda correspondiente al tamaño esperado del *ORF3*. Esto indica que el clonado del gen *ORF3* en el plásmido de expresión fue exitoso.

El *sorting* mediante citometría de flujo permite la selección de las células que expresan la proteína fluorescente y por ende también la proteína de interés *proORF3*. Al cabo de varios *sorting* se observaron las células bajo microscopio de epifluorescencia empleando el filtro correspondiente a

FITC. Las células obtenidas expresaban la proteína *GFP* y la mantenían a lo largo de los pasajes por lo que la transfección estable fue efectiva.

En los ensayos en los que se buscó evaluar la tasa de proliferación celular mediante recuento de células, no se observaron grandes diferencias entre las líneas transfectadas que expresaban la proteína de interés y la *wild type*. A partir de estos resultados, se puede inferir que la expresión de la proteína pro*ORF3* no afecta la tasa de proliferación celular, en contraste con la hipótesis planteada.

Lo mismo se observa en los resultados del ensayo colorimétrico con MTT. La absorbancia linealmente vinculada con la densidad celular muestra una diferencia más notoria en los pocillos en los que originalmente se colocaron 20.000 células que aquellos que partieron con 10.000. Esta mínima diferencia confirma que la proteína codificada por *ORF3* no afecta mayormente la tasa de crecimiento de las células transfectadas.

Por otro lado, y dado que luego de seis intentos de purificación de células por citometría de flujo no se pudo obtener la línea control esperada, otra posible explicación de los resultados es que el plásmido *pEGFP-C1* sin *ORF3* empleado genera un efecto tóxico en la célula que disminuye su tasa de multiplicación. De ser así, la proteína codificada por el *ORF3* podría estar revirtiendo este efecto, de manera de obtener un índice de propagación celular muy similar al *wild type*. Si fuese esta la explicación, la proteína sí cumpliría la función de favorecer la proliferación de las células, de manera que si el plásmido no estuviera afectando, el crecimiento de las células que incluyen la proteína producto del *ORF3* presentaría un crecimiento considerablemente mayor. Para comprobar o descartar esta hipótesis es necesario sustituir el plásmido de expresión. Varios vectores podrían cumplir con el rol de expresar la proteína insertada, incluyendo *pEGFP-N1*, *N2* y *N3*.

Con el objetivo de evaluar el rol de *ORF3* en la protección de la muerte celular se desarrollaron dos tipos de ensayos. Se sometieron a las células

a la inducción del proceso de apoptosis y luego se evaluó la morfología de los núcleos celulares mediante tinción con DAPI, y también se llevó a cabo un recuento de las células sometidas al tratamiento.

Los ensayos de apoptosis mostraron claras diferencias entre la línea celular que incluía el plásmido con el gen *ORF3* y las *wild type*. Los pocillos tratados con bajas concentraciones de H_2O_2 mostraron, para ambas líneas, células apoptóticas con membranas encogidas e irregulares y núcleos granulados y menor cantidad total de células, ya que muchas de las que estaban muertas se perdieron en los lavados de los pocillos antes de fijar las células. Las evidencias más claras de las diferencias se notaron cuando la inducción de la apoptosis celular fue provocada a concentraciones más altas del agente oxidante. En estos casos se observaron mucho menos células en la línea *wild type* que en aquellas que expresaban pro*ORF3*. Las células se observaron a distintos aumentos, y en todos los casos se evidenciaron notorias diferencias.

Por otro lado, se realizó el recuento celular de la línea *wild type* y de las que fueron transfectadas con *pEGFP-ORF3* a las que se les indujo la muerte celular por H_2O_2 a altas concentraciones. Se comparó la cantidad de células entre las distintas líneas, y también se contrastó con aquellas a las que no se les indujo apoptosis. Claramente la muerte fue estimulada efectivamente dado que la cantidad de células a las que se les incorporó H_2O_2 es mucho menor, tanto para las células transfectadas expresando *ORF3* como para las *wild type*, comparado con la cantidad de células en los pocillos que no fueron tratadas. Considerando estas últimas, el número de células de la línea *wild type* es menor a la mitad de las transfectadas. La inducción de la apoptosis por H_2O_2 fue mucho más evidente en las *A549 wild type* que en aquellas que incorporaron el plásmido con la proteína del *ORF3*.

Los resultados de ambos ensayos de apoptosis llevados a cabo en este proyecto fueron consistentes. Puede inferirse a partir de estos resultados

que la proteína codificada por *ORF3* cumple una clara función de inhibición de la muerte celular.

La muerte celular programada se considera un componente esencial de varios procesos como el correcto desarrollo y funcionamiento del sistema inmune. La inhibición de la apoptosis puede ser una vital estrategia para la reproducción del virus, ya que evitando la muerte del huésped puede completar su ciclo utilizando la maquinaria de reproducción de la célula.

Reportes previos han detectado otras proteínas encargadas de la supresión del proceso natural de muerte celular programada. Un ejemplo de estas son las proteínas de choque térmico, macromoléculas conservadas que se inducen en células al encontrarse en un entorno que las somete a estrés fisiológico. Se demostró su protección ante inducción de la apoptosis mediante dexametasona, ácido ursólico y H_2O_2 ⁴⁶. La proteína GroEL, chaperona molecular de las bacterias *E. Coli*, protege a las células de la muerte inducida por radiaciones UV⁴⁸. La evasión de la apoptosis es uno de los procesos principales en la transformación de la célula normal a maligna. El virus del papiloma humano también incluye una proteína que ofrece un mecanismo para la inhibición de la apoptosis. La proteína temprana E6 se une a la p53 (proteína supresora de tumores) con la ayuda de otras proteínas e impide que p53 induzca la detención del ciclo celular y la apoptosis⁴⁷.

CONCLUSIONES

El efecto que tiene la expresión del gen *ORF3* del *HEV* en las células A549 difiere parcialmente de lo que se propuso como hipótesis. La proteína *proORF3* parece no presentar ninguna relación con la proliferación celular, aunque este resultado no pudo ser validado. En el caso de la muerte celular programada, se observó que la expresión de la proteína *ORF3* protege a las células de sufrir el proceso de apoptosis ante inductores proapoptóticos. Este importante hallazgo nunca antes había sido reportado, y requiere nuevas investigaciones para ser validado y profundizado.

PERSPECTIVAS

- ✦ Los ensayos de apoptosis podrían extenderse utilizando técnicas de Anexina V, para confirmar lo antes planteado. La Anexina V es una proteína recombinante que se utiliza como un biomarcador efectivo de células apoptóticas que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina presentes en la cara externa de la membrana plasmática⁴⁸.

- ✦ La función de la proteína frente a la apoptosis celular puede evaluarse mediante la técnica *TUNEL* (*terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nickend-labeling*). Este es un método frecuentemente empleado para la identificación y cuantificación de la fracción de células apoptóticas en un cultivo.⁴⁹

- ✦ Otra línea celular podría ser evaluada para confirmar lo observado en este proyecto. Al encontrarnos frente a *HEV*, una buena opción alternativa de estudio podría ser una línea celular hepática como HepG2.

BIBLIOGRAFÍA

¹Cordeiro, N., Taroco, R., Chiparelli, H., "Virus de la Hepatitis", Temas de Bacteriología y Virología médica, Capítulo 27, pg. 477-512.

²Purcell, R.H. and Emerson, S.U. 2001. "Animal Models of Hepatitis A and E", ILAR Journal, Vol. 42(2), pg. 161-177.

³Méndez-Sánchez Nahum, Misael Uribe, "Hepatología. Conceptos básicos y clínicos.", Capítulo 25, Edición 1, 2016.

⁴Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F., Izopetb, J., "Hepatitis E Virus Infection", ClinicalMicrobiologicalReviews, Volumen 27 N°1, enero 2014, pag.117.

⁵Francisco Rodríguez-Frias, Rosendo Jardí, María Buti, "Hepatitis E: virología molecular, epidemiología y patogénesis", Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, Vol. 30, N° 10 , diciembre 2012.

⁶Organización Mundial de la Salud, "Hepatitis E", Centro de prensa, Nota descriptiva N°280, julio 2015.

⁷Sánchez Partidas, D. A., Gutiérrez García C. R., "Virus de la hepatitis E. Características biológicas y epidemiológicas", Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, Vol.32, N° 1, junio 2 012.

⁸Berke T, Matson DO. "Reclassification of the Caliciviridae into distinct genera and exclusion of hepatitis E virus from the family on the basis of comparative phylogenetic análisis".Arch Virol. 2000; 145:1421-36.

⁹ Tanno H, Hay O. "Hepatitis viral en América Latina.", ActaGastroenterolLatinoam. 2005; 35:169-82.

¹⁰ National Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Viral hepatitis. <http://www.cdc.gov/hepatitis/>. Acceso 25 de febrero 2011.

¹¹ Singh J, Aggarwal NR, Battacharjee J, et al. An outbreak of viral hepatitis E: role of community practices. *J Commun Dis* 1995;27:92-6.

¹² Bandyopadhyay S, Khera AK, Banerjee K, et al. An investigation of an outbreak of viral hepatitis in a residential area of Delhi. *J Commun Dis* 1993;25:67-70.

¹³ Nayak NC, Panda SK. "Enteric non-A, non-B virus hepatitis in India: current experiences in various settings including transmission studies in the rhesus monkey." In: Shikata T, Purcell RH, Uchida T, eds. "Viral hepatitis C, D, and E: proceedings of the international meeting on non-A, non-B hepatitis." Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers BV, 1991:247-57.

¹⁴ Myint H, Soe MM, Khin T, Myint TM, Tin KM. "A clinical and epidemiological study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Rangoon." *Am J Trop Med Hyg.* 1985; 34:1183-9

¹⁵ Hillis A, Shrestha SM, Saha NK. "An epidemic of infectious hepatitis in the Kathmandu Valley." *J Nepal Med Assoc.* 1973:11-51.

¹⁶ Clemente-Casares P, Pina S, Buti M et al. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:448-9.

¹⁷ Buisson Y, Coursaget P, Bercion R, Anne D, Debord T, Roue R. Hepatitis E virus infection in soldiers sent to endemic regions. *Lancet.* 1994; 344:1165-6.

¹⁸ Velazquez O, Stetler HC, Avila C, Ornelas G, Alvarez C, Hadler SC, Bradley DW, Sepulveda J Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA.* 1990; 263:3281-5.

¹⁹ Echevarría, J.M., González, J.E., Lewis-Ximenez, L.L., Lopes dos Santos, D.R., Munné, M.S., Pinto, M.A., Pujol, F.H., Rodríguez-Lay, L.A. ,

“Hepatitis E Virus Infection in Latin America: A Review”, *Journal of Medical Virology*, 85:1037–1045, 2013

²⁰Hurtado C, Muñoz G, Brahm J., “Anti-VHE IgM en casos de infección por el virus de hepatitis E.”, *RevMed Chile*. 2005; 133:645-7.

²¹Pujol F, Favorov MO, Marcano T, Esté JA, Magris M, Liprandi F et al. “Prevalence of antibodies against hepatitis E virus among urban a rural populations in Venezuela.”, *J Med Virol*. 1994; 42:234-6.

²²León P, Venegas E and Bengoechea L. Prevalencia de las Infecciones por virus de las hepatitis B, C, D y E en Bolivia. *Rev PanamSaludPública*. 1999; 5:144-52

²³Cruells, M. R., Mescia, G., Gaibisso, R., Ramírez, M., Gutiérrez, M., Kohen, S. “Epidemiological study of hepatitis A and E viruses in different populations in Uruguay”.*Gastroenterología y Hepatología*, 1997 20(6):295–298.

²⁴Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C., Gagliano, G., Arbiza, J., “Detection and molecular characterization of sporadic cases of acute human hepatitis E virus infection in Uruguay” *Archives of Virology*, agosto 2011, 156:1451–1454

²⁵Mirazo, S., Ramos, N., Russi, J. C., Arbiza, J., “Genetic heterogeneity and subtyping of human Hepatitis E virus isolates from Uruguay”, *Virus Research*, Vol. 173, N^o2, mayo 2013, pag. 364–370.

²⁶ Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S., Arbiza, J., “Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update”, *Hepatic Medicine: Evidence and Research*, 2014:6, junio 2014, pag. 45-59.

²⁷Smith D. B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S. U., Harrison, T. J., Meng, X., Okamoto, H., Van der Poel, W., H., M., Purdy, M. A., “Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae”, *Journal of General Virology*, junio 2014, 95, 2223–2232

²⁸Krain, L. J., Nelson, K. E., Labrique, A. B., “Host Immune Status and Response to Hepatitis E Virus Infection”, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 27 N° 1, enero 2014, p. 139–165

²⁹Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Ruggeri, F. M., Sellwood, J., Nasser, A., Sao, M., Nascimento, J., D’Agostino², M., Santos, R., Saiz, J. C., Rzezutka, A., Bosch, A., Gironés, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovac, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C., de Roda Husman, A. M., Hernández, M., van der Poel, W. H. M., “Virus hazards from food, water and other contaminated environments”

³⁰ Ariel Quintana-González, A., “Virus de la hepatitis E”, *Revista Biomédica*, 2003; 14:165-189.

³¹Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(18):9860–9865.

³²Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat*. 2009; 16(7): 519–523.

³³ Albert W. Tam, Matthew M. Smith, Martha E. Guerra, Chiao-Chain Huang, Daniel W. Bradley, Kirk E. Fry, Gregory R. Reyes, “Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome”, Vol. 185, noviembre 1991, Pag. 120-131

³⁴ Xing L, Li TC, Mayakaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, et al. “Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent

viral assembly pathway.”, *J Biol Chem.* 2010;285:33175–83.

³⁵Zafrullah, M., Ozdener, M. K., , Panda, K. S., Jameel, S., “The ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Is a Phosphoprotein That Associates with the Cytoskeleton”, *Journal of Virology*, Vol. 71, No. 12, diciembre 1997, p. 9045–9053.

³⁶Tyagi, S., Korkaya, H., Zafrullah, M., Jameel, S., Lal, S. K., “The Phosphorylated Form of the ORF3 Protein of Hepatitis E Virus

Interacts with Its Non-glycosylated Form of the Major Capsid

Protein, ORF2”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 25, junio 2002, pp. 22759–22767.

³⁷Scott P. Kenney, R. S. Pudupakam, Yao-Wel Huang, F. William Pierson, Tanya LeRoith, Xiang-Jin Meng, “The PSAP Motif within the ORF3 Protein of an Avian Strain of the Hepatitis E Virus Is Not Critical for Viral Infectivity In Vivo but Plays a Role in Virus Release”, *Journal of Virology*, Vol. 86, N°10, mayo 2012, p. 5637-5646.

³⁸Tyagi, S., Jameel, S., Lal, S. K., “Self-Association and Mapping of the Interaction Domain of Hepatitis E Virus ORF3 Protein”, *Journal of Virology*, Vol. 75, No. 5, marzo 2001, p. 2493–2498

³⁹Vivek Chandra, V., Kalia, M., Hajela, K. and Jameel, S., “The ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Delays Degradation of Activated Growth Factor Receptors by Interacting with CIN85 and Blocking Formation of the Cbl-CIN85 Complex” *Journal of Virology*, Vol. 84, No. 8, abril 2010, p. 3857–3867.

⁴⁰Kannan, H., Fan, S., Patel, D., Bossis, I., and Zhang, Y., “The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 3 Product Interacts with Microtubules and

Interferes with Their Dynamics”, *Journal of Virology*, Vol. 83, No. 13, julio 2009, p. 6375–6382

⁴¹Addgene, “pEGFP-C1”, Addgene plasmids, Vector Database.

⁴²Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell, “*Biología Celular y Molecular*”, 5ta edición, 2005, pag. 379.

⁴³Escobar, L., Rivera, A., Aristizábal, F. A., “Estudio comparativo de los métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas”, *Vitae*, revista de la facultad de química farmacéutica, Vol. 17, febrero 2010, pag. 67-74

⁴⁴Chazotte, B., “Labeling Nuclear DNA Using DAPI”, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, doi:10.1101

⁴⁵Gallego-Pinazo, R., Zanón Moreno, V., Sanz, S., Andrés, V., Serrano, M., García-Cao, I., Pinazo-Durán, M. D., “Caracterización bioquímica del nervio óptico en el ratón que sobreexpresa el gen p53. Análisis de estrés oxidativo.”, *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 83(2), febrero 2008, pag. 105-111

⁴⁶Ortega, Y., “Proteína de choque térmico de 60kDa de *Klebsiella pneumoniae* en la apoptosis”, Tesis de doctorado en ciencias quimicobiológicas, Instituto Politécnico Nacional, Méjico, junio 2011

⁴⁷Luis Felipe Jave-Suárez, L. F., Ratkovich-González, S., Olimón Andalón, V., Aguilar-Lemarroya, A., “Modulación de la apoptosis por el virus del papiloma humano”, *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 2015, 53 Supl 2:S200-5.

⁴⁸Van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P., “Annexin V-affinity assay: a review on an

apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure”,
Cytometry 31:1–9, enero 1998.

⁴⁹Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, P., Drouet, C., Robert, C.,
Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E., “In Situ Apoptotic Cell Labeling
by the TUNEL Method: Improvement and Evaluation on Cell
Preparations”, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 44,
No. 9. , 1996, pp. 919-968.