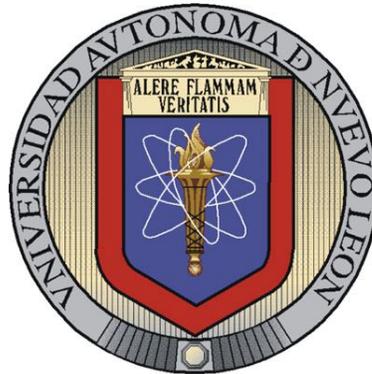


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN REPLICÓN
SUBGENÓMICO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, CON RNA'S DE
INTERFERENCIA.**

Por:

Q.B.P. REGINA ELIZONDO GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS
con especialidad en MICROBIOLOGÍA

Agosto, 2008

**INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN REPLICÓN
SUBGENÓMICO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, CON RNA'S DE
INTERFERENCIA**

Comité de Tesis

Director de Tesis

Dra. Laura María Trejo Ávila

Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal

Dra. Ana María Rivas Estilla

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Laura María Trejo Ávila y la co-dirección de la Dra. Ana María Rivas Estilla.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	vii
DEDICATORIA.....	viii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo General.....	4
3.2. Objetivos Particulares	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1 Epidemiología.....	7
4.2. Forma de Transmisión	8
4.3. Aspectos Clínicos	9
4.4. Estructura Molecular del Genoma del VHC	10
4.5. Replicación.....	15
4.6. Genotipos	17
4.6.1. Distribución Geográfica de los Genotipos.....	18
4.7. Respuesta Inmune	20

4.8. Tratamientos para Combatir la Hepatitis C	20
4.9. Terapia Génica.....	22
4.9.1. Oligonucleótidos Antisentido	23
4.9.2. Ribozimas	24
4.9.3. RNA de Interferencia	24
4.9.3.1 siRNA como Terapia Génica.	27
4.9.3.2. Estrategias del siRNA “in vivo”	29
5. METODOLOGÍA.....	34
5.1. Diseño Experimental.....	34
5.2. Cultivo Celular	35
5.2.1. Mantenimiento	35
5.2.2. Pase Celular	35
5.2.3. Conteo de Células	35
5.3. Generación de siRNA	36
5.4. Transfección	36
5.4.1. Transfecciones para Extracción de Proteínas.	37
5.4.2. Transfecciones para Extracción de RNA.....	37
5.5. Extracción de Proteínas.....	37
5.6. Western blot.....	38
5.6.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	39
5.6.2. Transferencia a Membrana de Nitrocelulosa	39
5.6.3. Inmunodetección	40
5.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	41
5.7.1. Extracción RNA.....	41
5.7.2. RT-PCR	42
5.7.3. PCR Tiempo Real	42
5.8. Análisis Estadístico.....	43
6.- RESULTADOS	44
6.1 Ensayos de Viabilidad Celular en la línea de hepatocitos Huh-7-VHC expuestas a diferentes concentraciones del agente de transfección SIPORT Lipid a los 6 días de la transfección	44
6.2 Ensayo de viabilidad celular por MTT de células transfectadas con 200 nM utilizando un siRNA y diferentes cantidades del agente de transfección SIPORT Lipid.	46
6.3. Inhibición de la replicación y expresión del subgenómico del VHC utilizando el RNA de interferencia “A” dirigido contra la región del gen NS5b.....	48
6.3.1. Inhibición de la replicación del RNA subgenómico del VHC.....	48
6.3.2. Inhibición de la expresión de la proteína NS5b.	49
6.4. Inhibición de la replicación y expresión del subgenómico del VHC utilizando el RNA de interferencia “B” dirigido contra la región del gen NS5b.....	51
6.4.1. Inhibición de la replicación del RNA subgenómico del VHC.....	51
6.4.2 Inhibición de la expresión de la proteína NS5b.	52

6.5. Inhibición de la replicación y expresión del subgenómico del VHC utilizando el RNA de interferencia “C” dirigido contra la región del gen NS5b.	54
6.5.1. Inhibición de la replicación del RNA subgenómico del VHC.....	54
6.5.2. Inhibición de la expresión de la proteína NS5b	55
6.6. Inhibición del subgenómico del VHC utilizando el RNA de interferencia “A” en combinación con el siRNA “C”.	57
6.6.1. Inhibición de la replicación del RNA subgenómico del VHC utilizando las combinaciones del siRNA “A” y “C”.	57
6.6.2. Inhibición de la expresión de la proteína NS5b utilizando las combinaciones de los RNA’s de interferencia “A” y “C”.	58
7. DISCUSIÓN.....	60
8. CONCLUSIONES	65
LITERATURA CITADA	67
APÉNDICE.....	80
RESUMEN BIOGRÁFICO	83

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Laura Trejo, por permitirme realizar este proyecto y continuar en el camino de la investigación. Por todo el apoyo, tiempo y paciencia que me ha brindado, pero sobretodo por sus consejos, los cuales me han ayudado en mi desarrollo profesional.

Al Dr. Pablo, por su ayuda durante la realización de la tesis, por sus consejos que me permitieron avanzar a nivel profesional.

A la Dra. Ana María Rivas por permitirme realizar este trabajo, por su asesoría y facilidades para la realización de este trabajo.

A Karina, por toda la ayuda que me brindó, por la enorme paciencia y ante todo por ser una gran amiga.

A todos mis compañeros de Infectología Molecular, especialmente a Clarita y Dianis, que me tuvieron mucha paciencia y por toda la ayuda que me brindaron... muchas gracias.

A todos mis compañeros del laboratorio de inmunología: Maria Elena, Chago, Paty, Martita, Armando, Fernanda, Ana, Diana, Edgar, Emmanuel, Marisol, Vianey que me brindaron toda su ayuda pero ante todo su amistad.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios así como a PAICYT por el financiamiento de este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A Dios, por permitir mi realización personal y profesional, por darme salud y fuerza para seguir adelante.

Gracias Alberto, por el amor, comprensión y apoyo que siempre me has dado. Por estar a mi lado. Ahhh y no creas que se me olvidó, gracias por las asesorías estadísticas.

A mi madre, por brindarme el apoyo necesario para seguir, por sus consejos los cuales me hicieron posible llegar a este momento.

A mi hermana, por que siempre me aguanta y soporta. Por ayudarme siempre en todo.

A mi tía Cruz, por estar siempre al pendiente, por toda su ayuda consejos y comprensión. A mis primos Martha, Ismael y Rosy así como a mis sobrinos Fanny e Ismaelito quienes siempre me han ayudado.

Y a todos los que me ayudaron a realizar este trabajo.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Homología y nomenclatura de las variantes del VHC.....	18
II. Tabla de secuencias de los siRNAs sintetizados por Ambion.....	36
III. Condiciones del PCR Tiempo Real para VHC y GAPDH.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Representación porcentual de las principales causas de enfermedades crónicas en hígado.....	6
2. Historia Natural de la Infección con VHC.....	7
3. Estructura molecular del VHC.....	11
4. Replicación del VHC.....	16
5. Distribución de los genotipos del VHC a nivel mundial.....	19
6. Modelo de replicones subgenómicos del VHC en células hepáticas.....	23
7. Mecanismo de acción del RNA de interferencia.....	26
8. Desafíos que debe superar el RNAi antes de ser utilizado como agente terapéutico.....	29
9. Representación gráfica de la transferencia de las proteínas en dirección de polo negativo a positivo.....	40
10. Gráficas de viabilidad celular en células Huh-7-VHC expuestas a diferentes cantidades del agente de transfección SIPORT Lipid y analizadas a los 6 días posteriores a la exposición.....	45
11. Gráfica de viabilidad celular en células Huh-7-VHC expuestas a 200 nM de siRNA.....	47
12. Resultados del RT-PCR Tiempo Real en células transfectadas con 100nM y 200nM del siRNA “A” y analizadas a los 2, 4 y 6 días post-transfección.....	49
13. Efecto del siRNA “A” contra NS5b en la expresión del VHC en células	

Huh-7-VHC.....	50
14. Resultados del RT-PCR Tiempo Real en células transfectadas con 100nM y 200nM del siRNA “B” y analizadas a los 2, 4 y 6 días post-transfección.....	52
15. Efecto del siRNA “B” contra NS5b en la expresión del VHC en células Huh-7-VHC.....	53
16. Resultados del RT-PCR Tiempo Real en células transfectadas con 100 nM y 200 nM del siRNA “C” y analizadas a los 2, 4 y 6 días post-transfección.....	55
17. Efecto del siRNA “C” contra NS5b en la expresión del VHC en células Huh-7-VHC.	56
18. Resultados del RT-PCR Tiempo Real en células transfectadas con 100nM del siRNA “A” y 100 nM del siRNA “C” y analizadas a los 2 y 4 días post-transfección.....	58
19. Efecto de la combinación del siRNA “A” y “C” dirigidos contra NS5b en la expresión del VHC en células Huh-7-VHC.....	59

NOMENCLATURA

μg	Microgramo
μl	Microlitro
° C	Grados Celsius
BSA	Albúmina Bóvina Sérica
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHC	Carcinoma hepatocelular
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
CO ₂	Bióxido de Carbono
CTL	Linfócito T Citotóxico
DEPC	Dietilpolicarbonato
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dsRNA	RNA bicatenario
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF2 α	Factor de iniciación eucariota 2 α
EMCV	Virus de la Encefalomiocarditis
FHV	Virus Herpes Felino
FKBP38	Proteína 38 de unión FK 506
G418	Antibiótico aminoglicósido
g	Gramo
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HCl	Ácido clorhídrico
HEK 293T	Línea celular de riñón de embriones humanos
hPLIC1	Proteína humana homóloga 1 de unión a integrina asociada a proteína y citoesqueleto
Huh-7	Línea celular de hepatoma humano
Huh-7-VHC	Línea celular de hematoma humano que expresa replicón subgenómico del Virus de la Hepatitis C
HuR	Hu antígeno R
HVR	Regiones hipervariables
IFN	Interferón
IRES	Sitio Interno de entrada a ribosomas
ISRE	Elementos de Respuesta Estimulados por Interferón
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodaltons

mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 bromuro difeniltetrazolium
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
NPT II	Gen de la neomicina fosfotransferasa II
nts	Nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de Hidrógeno
PKR	Proteína Cinasa R
PSA	Persulfato de Amonio
PSMA 7	Proteosoma Alfa subunidad 7
RES	Sistema Retículo Endotelial
RISC	Complejo de inducción del silenciamiento de RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
siRNA	RNA de interferencia corto
T.A.	Temperatura ambiente
Taq	Thermophilus acuaticus
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
UTR	Región no traducible
V	Volts
VAMP	Proteína de Membrana Asociada a Vesículas
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

La infección con el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud pública a nivel mundial y es considerada como una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular. En México; aproximadamente el 1.2 % de la población se encuentra infectada con el VHC. Actualmente, la única terapia disponible es el tratamiento combinado de Interferón alfa pegilado y ribavirina; sin embargo, solo un 50-55% de los pacientes logra una respuesta sostenida al final del tratamiento. La terapia génica constituye una alternativa prometedora en el tratamiento contra VHC; y existen diversos estudios en los que se ha logrado un bloqueo exitoso de la expresión y replicación del virus. El empleo del RNA de interferencia (RNAi) como terapia contra el VHC ha sido de gran interés debido a su gran potencial terapéutico y alta especificidad. En este trabajo se estableció como principal objetivo inhibir la expresión y replicación del RNA del Virus de la Hepatitis C en un modelo “in vitro”, a través del bloqueo selectivo de una secuencia conservada del gen NS5b, mediante la tecnología de RNA de interferencia. Se utilizó la línea celular de hepatocitos Huh-7-VHC (línea celular que expresa establemente un replicón subgenómico del VHC), la cual fue transfectada con 3 siRNAs seleccionados contra diversas regiones del gen viral NS5b de manera individual y combinada y se analizó la inhibición de la expresión de la polimerasa viral y la replicación del genoma del VHC. Las células tratadas con el siRNA “A” mostraron una mayor inhibición en los niveles de RNA viral a los 6 días post-transfección, con inhibiciones de 86 y 88% con 100 y 200 nM. En cuanto al siRNA “B”, no se observan cambios significativos en los niveles de RNA viral a los 2 días pos-transfección, mientras que a los 4 y 6 días postransfección se obtuvo un aumento significativo en el RNA viral con respecto al control. Con el siRNA “C” se observó inhibición significativa a los 2 y 4 días post-transfección de alrededor del 57%, sin embargo dicha reducción no se observa a los 6 días post-transfección. Al realizar las combinaciones de estos siRNAs no se observó una ventaja al utilizarlos de manera combinada, obteniéndose una menor inhibición viral al utilizar el siRNA “A” de manera individual. En base a los resultados obtenidos concluimos que el siRNA “A” fue el que presentó la mejor inhibición del VHC de los 3 siRNAs evaluados, y al compararlo en forma individual y combinada nos aporta datos útiles en la comprensión del mecanismo del RNA de interferencia

ABSTRACT

The Infection with Hepatitis C virus (HCV) is a worldwide public health problem and it is considered as one of the main causes of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Approximately 1.2% of the population in Mexico is infected with HCV. Currently the only therapy available is the combined treatment of pegylated interferon and ribavirin; nevertheless only 50% to 55% of the patients present a sustained positive response by the end of the treatment. Genetic treatments constitute a promising alternative for the treatment against HCV and there have been several studies in which a successive blocking of the expression and replication of the virus has been achieved. The use of the RNA interference (RNAi) as a therapy against HCV has been of huge interest due to its great therapeutic potential and high specificity. The main objective of this work is to inhibit the expression and replication of the RNA of the Hepatitis C Virus in an “in vitro” model by selectively blocking a preserved sequence of the NS5b gene using the RNA interference technology. A Huh-7-VHC replicon cell (cellular line that expresses a stable subgenomic replicon of HCV) was used; it was transfected, individually and combined with 3 selected siRNAs against diverse regions of the viral gene NS5b; then inhibition of the polymerase viral expression and the replication of the HCV genome was analyzed. The cells that were treated with the siRNA “A” presented a higher inhibition of the viral RNA levels during the 6 days post-transfection with inhibitions of 86% and 88% with 100 and 200 nM. The siRNA “B” no presented changes in the viral RNA 2 days after the transfection and at the 4th and 6th day after the transfection an increase in the viral RNA was obtained compared to the control. With the siRNA “C” an inhibition was observed at the 2nd and 4th day post-transfection of 57%, never the less this reduction can't be observed at the 6th day post-transfection. No advantage was observed when combining the siRNAs obtaining a minor viral inhibition when using the “A” siRNA individually. Based on the results obtained, we conclude that the “A” siRNA presented the best HCV inhibition of the 3 siRNAs evaluated, and when compared individually and combined it gives useful data in the RNA interference mechanism comprehension.

1. INTRODUCCIÓN

El Virus de la Hepatitis C (VHC) se encuentra distribuido ampliamente en el mundo y se estima que más de 200 millones de personas se encuentran infectadas con este virus (3%) y aproximadamente de 3 a 4 millones de personas se infectan cada año (Poynard *et al.*, 2003; Trujillo-Murillo *et al.*, 2004). El VHC tiene un alto grado de evolución a cronicidad, provocando que mas del 80% de las personas infectadas desarrollen hepatitis crónica, y paulatinamente progresar a enfermedades hepáticas mas serias como cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular.

En México, la hepatitis C y el alcoholismo son las principales causas de cirrosis hepática, la cual representa la segunda causa de muerte en personas entre 35 y 55 años (Méndez-Sánchez *et al.*, 2004; Trujillo-Murillo *et al.*, 2004).

En años recientes, las opciones de los tratamientos para combatir la infección crónica causada por VHC han sido mejoradas, sin embargo solo logran resolver hasta un 56% de los casos (Feld y Hoofnagle, 2005). La alta heterogeneidad genética del VHC reduce la efectividad de los tratamientos antivirales. Adicionalmente, la aparición de infecciones resistentes a los tratamientos incrementa la necesidad de encontrar diversos puntos de ataque para limitar el escape viral (McHutchison y Patel, 2002).

Mediante la tecnología del RNA de interferencia se ha logrado inhibir la producción de virus de importancia médica como el VIH, virus respiratorio sincital, poliovirus, virus del dengue, FHV y el VPH (Gitlin y Andino, 2003).

El RNA de interferencia (RNAi), es un proceso de silenciamiento génico en el cual RNA's de doble cadena (dsRNA) se unen específicamente a una secuencia complementaria blanco para su degradación por nucleasas celulares. Su aparición como herramienta para silenciar la expresión de genes ha estimulado un gran interés en su potencial terapéutico (Randall *et al.*, 2003).

En cuanto al VHC, debido a que su genoma consta de un RNA de polaridad positiva, se sugiere que es un blanco particularmente atractivo para la terapia con RNA de interferencia, con un gran potencial para resolver las infecciones por VHC en los pacientes infectados.

2. HIPÓTESIS

La replicación y expresión génica del virus de la Hepatitis C se pueden inhibir mediante siRNAs dirigidos contra diferentes regiones del gen NS5b y el uso combinado de los siRNAs aumenta dicha inhibición.

3.1. OBJETIVO GENERAL

Inhibir la biosíntesis de un subgenómico de VHC por degradación del RNA viral con siRNAs dirigidos contra regiones conservadas del gen NS5b

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la citotoxicidad celular del agente de transfección SIPORT Lipid y siRNAs en la línea celular Huh-7-VHC.

Analizar la replicación del RNA viral en la línea celular Huh7-VHC transfectada con los siRNAs A y/o B y/o C dirigidos contra la región NS5b.

Analizar la expresión de la polimerasa del VHC en la línea celular Huh7-VHC transfectada con los siRNAs A y/o B y/o C.

4. ANTECEDENTES

La hepatitis es un proceso inflamatorio del hígado la cual puede tener diversas causas entre las que se encuentran; el alcohol, medicamentos, enfermedades auto inmunes, infecciones bacterianas y agentes virales como los virus de la hepatitis A, B, C, D, G y E (figura 1). Estos virus de la hepatitis humana son endémicos a través del mundo.

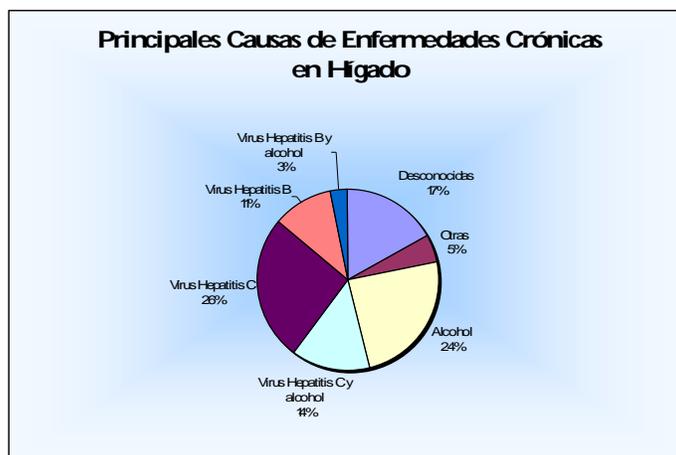


Figura 1. Representación porcentual de las principales causas de enfermedades crónicas en hígado

La infección con el virus de la hepatitis C es un problema de salud pública a nivel mundial. La hepatitis C es considerada como una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis, carcinoma hepatocelular y trasplante de hígado (Tanaka *et al.*, 1995; Thierry *et al.*, 2003).

En general, la trascendencia de esta enfermedad radica en su elevada frecuencia

de evolución a cronicidad (55-85%) con posibilidad de desarrollo, en mayor o menor medida, de cirrosis hepática y/o hepatocarcinoma (Hoofnagle, 2002).

El tiempo necesario para la progresión a una enfermedad hepática mas seria, es extremadamente variable, puede ser tan corto como 2 años o tan largo como 10 a 30 años después de la infección (Trujillo-Murillo *et al.*, 2004). Sin embargo, se puede progresar rápidamente en pacientes con edad avanzada y en personas consumidoras de alcohol (Valladares-Álvarez *et al.*, 2003; Trujillo-Murillo *et al.*, 2004).

Del 75 al 85% de los pacientes progresan a hepatitis crónica, de ellos el 20 al 30% desarrolla cirrosis (figura 2) y de estos del 1 al 5% desarrolla carcinoma hepatocelular (Aguilar-Ramírez *et al.*, 2002; Rivas-Estilla *et al.*, 2003; Penin *et al.*, 2004).

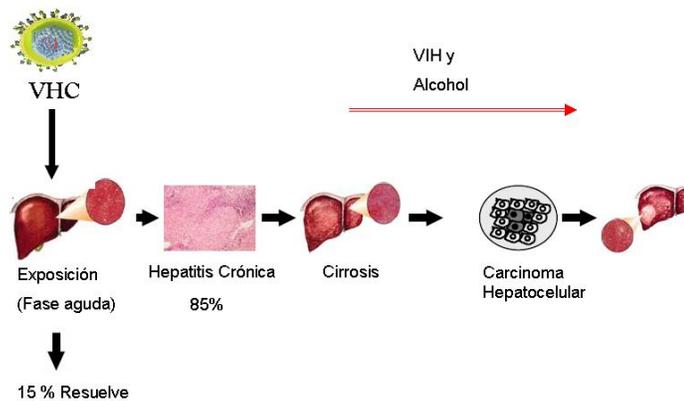


Figura 2. Historia Natural de la Infección con VHC

4.1 Epidemiología

Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que más de 200 millones de personas se encuentran infectadas con el VHC. Además reporta que el país con mayor prevalencia es la República Unida de Tanzania, con 72.2%, aunque este valor está

basado en un solo estudio, seguida por Egipto con una prevalencia de 18.1%, Ruanda con 17% y Bolivia con 16.30%. Otros países que presentan una prevalencia mayor del 10% son Camerún, Burundi, Guinea y Mongolia (WHO, 1997)

En nuestro país, la prevalencia de la infección por VHC asciende al 1.2 % de la población. De acuerdo al último censo de la población (alrededor de 100 millones) podría inferirse que en la actualidad existen alrededor de 1 200 000 personas infectadas en nuestro país (Uribe y Méndez-Sánchez, 2002).

4.2. Forma de Transmisión

Existen diversos caminos por los cuales se puede contraer o transmitir la hepatitis C, estos incluyen el contacto con sangre, transfusiones sanguíneas, transmisión percutánea por exposición a objetos punzocortantes y el uso de drogas intravenosas (Thierry *et al.*, 2003; Trujillo-Murillo *et al.*, 2004).

Otras vías de transmisión son la sexual asociada a promiscuidad y la transmisión vertical (madre-hijo), en la cual se incrementa el riesgo de 20-30% cuando la madre es VIH positivo (Choo *et al.*, 1989; Poynard *et al.*, 2003; Trujillo-Murillo *et al.*, 2004).

La transmisión nosocomial durante la diálisis, colonoscopia y cirugía también ha sido reportada (Richter, 2002).

Los factores de riesgo potenciales incluyen realización de tatuajes, acupuntura, perforaciones, encarcelamiento, servicio militar, viajes al extranjero; estos han sido evaluados en estudios de control de casos de infecciones agudas (Zein, 2003).

4.3. Aspectos Clínicos

El período medio de incubación de la hepatitis C es de 6-7 semanas, con un rango entre 2 semanas y 6 meses (Thierry *et al.*, 2003).

En la hepatitis aguda los casos sintomáticos suelen ser inespecíficos, entre los cuales se encuentran: astenia, anorexia, dolor abdominal, etc. (Thierry *et al.*, 2003).

La hepatitis crónica C se caracteriza por presentar escasa expresividad clínica, excepto en etapas avanzadas. La mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos durante muchos años o presentan síntomas poco específicos, en forma de astenia, dolor vago en el hipocondrio derecho o trastornos digestivos mal sistematizados, que podrían ser de origen funcional. Las manifestaciones extra hepáticas son frecuentes y típicas, como la crioglobulinemia, artralgias, enfermedades autoinmunes de cualquier órgano, etc. Este es un mecanismo no específico, que se mantiene mientras la lesión persista, y al ser el VHC una infección de tipo crónico, se convierte en una patología (Marcellin *et al.*, 2002).

Cirrosis es la etapa final de progresión de la fibrosis. Es una enfermedad crónica e irreversible. Los síntomas definidos son ascitis, hemorragia gastrointestinal, insuficiencia hepática e ictericia. También se acompaña de hepatomegalia, esplenomegalia, hemorroides y distensión de venas abdominales. Su pronóstico es grave y los pacientes suelen fallecer por hemorragias digestivas o insuficiencia hepatocelular (Robbins, 1968; Thierry *et al.*, 2003).

El carcinoma hepatocelular (CHC) es un tumor que se presenta como una masa dolorosa y de crecimiento progresivo en el hígado. Los pacientes fallecen debido a una caquexia maligna, ruptura del tumor con hemorragia en la cavidad peritoneal,

várices o insuficiencia hepática. Los carcinomas hepatocelulares pueden alcanzar un gran tamaño antes de generar metástasis (Rubin y Farber, 1992).

De acuerdo con diversos estudios, los intervalos entre la infección por VHC y la detección de sus secuelas es de 10 a 14 años para hepatitis crónica, 21 a 25 años para cirrosis y de 28 a 29 años para el CHC (Kapadia *et al.*, 2003).

4.4. Estructura Molecular del Genoma del VHC

En 1989, Choo y colaboradores identificaron la secuencia completa del genoma del agente causal, conocido hasta entonces como No A no B Hepatitis (NANB). Con la tecnología de recombinación del DNA, fue posible la clonación del genoma y fue llamado posteriormente Virus de la Hepatitis C (Trujillo-Murillo *et al.*, 2004).

Este virus se clasificó dentro de la familia Flaviviridae, en un nuevo género denominado hepacivirus, siendo el VHC su único miembro (Feinstone *et al.*, 1973; He *et al.*, 1987; Westaway *et al.*, 1985; Bartenschlager y Lohmann, 2001).

El genoma del VHC tiene una longitud aproximada de 9600 nucleótidos y esta compuesto por una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, con un solo marco de lectura abierto (Bartenschlager y Lohmann, 2000; Lohmann *et al.*, 1999; Puig-Basagoiti y Sáiz, 2001).

Este RNA codifica para una poli-proteína viral de aproximadamente 3010 a 3033 aminoácidos (Drazan, 2000; Méndez-Sánchez *et al.*, 2004). Esta poliproteína es procesada por proteasas celulares y virales para generar 10 polipéptidos (figura 3). Las proteínas no estructurales son liberadas de la poliproteína después de un corte realizado por las proteasas NS2-3 y NS3-4, mientras que las proteínas estructurales son cortadas por peptidasas del Retículo Endoplásmico del hospedero (Reed y Rice,

2000). Adicionalmente, el marco abierto de lectura del VHC contiene un traslape de +1 lo cual origina la síntesis de una proteína adicional (Branch *et al.*, 2005). El genoma viral no posee estructura cap ni cola de poly A en los extremos 5' y 3' respectivamente (El-Serag y Mason, 1999). En lugar de estas estructuras, el genoma del VHC está flanqueado por dos regiones no traducibles (UTRs) los cuales son esenciales en la replicación y síntesis de las proteínas virales (Rosenberg, 2001). La primera de esta región es conocida como 5' UTR, debido a que está localizada en el inicio de la secuencia de nucleótidos y contiene secuencias altamente conservadas. Dentro de esta región (nucleótidos 44 al 354), se encuentra un área conocida como sitio de unión a ribosomas (IRES) la cual es el elemento del RNA que se fija a los ribosomas para comenzar la traducción del RNA viral lo cual permite que la infección se produzca (Rosenberg, 2001; Friebe y Bartenschlager, 2002).

Los primeros 45 nucleótidos del genoma del VHC no son requeridos en la traducción, pero basados en la analogía con otros virus de RNA de cadena positiva, esta secuencia esta probablemente involucrada en la replicación del virus (Bartenschlager y Lohmann, 2000). La segunda secuencia es llamada 3' UTR, debido a que está localizada al final del genoma viral y se conforma de tres regiones: una región variable, un tracto de poli U que es de longitud variable y una región altamente conservada de 98 nucleótidos conocida como región X la cual es esencial para la replicación viral (Kiyosawa *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1995; Yanagi *et al.*, 1999).

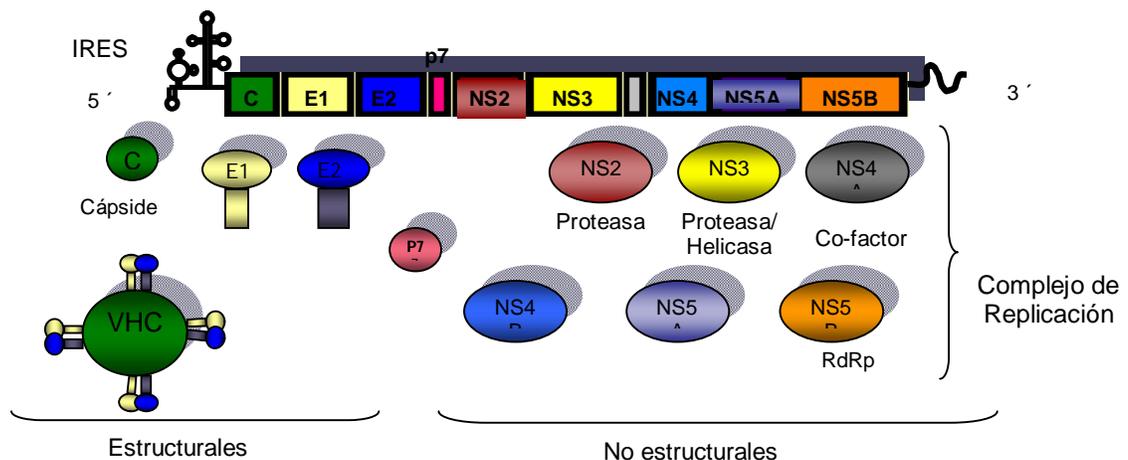


Figura 3. Estructura molecular del VHC.

El procesamiento de la poli-proteína se encuentra regulado por una combinación de proteasas tanto del hospedero como virales, la cual genera 10 proteínas. En el extremo amino terminal se encuentran las proteínas estructurales: la proteína básica del core (C) y las glicoproteínas E1 y E2. Después de la región estructural se encuentra una pequeña proteína integral de membrana, p7. El resto del genoma codifica para las proteínas no estructurales NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b (Brett y Charles, 2005).

Las proteínas estructurales participan en el ensamblaje de las partículas virales de los nuevos virus, mientras que las proteínas no estructurales están involucradas en la replicación viral, en el procesamiento de la poli-proteína y control de la maquinaria celular (Bartenschlager y Lohmann, 2000).

La proteína del core (C) contiene secuencias de aminoácidos altamente conservadas y es el componente principal de la nucleocápside (Rosenberg, 2001). La interacción entre las proteínas del core con la membrana celular y/o las glicoproteínas de envoltura es importante para la correcta morfogénesis de la partícula viral. Además, la proteína del core modula la transcripción, proliferación, muerte y señalización celular, así mismo interfiere con el metabolismo de los lípidos y suprime la respuesta inmune del huésped (Penin *et al.*, 2004).

Las proteínas de cubierta (E1 y E2) son proteínas transmembranales, altamente glicosiladas, que forman dos tipos complejos de heterodímeros estables, una forma ligada por puentes disulfuro, representando agregados mal plegados y un heterodímero unido no covalentemente correspondiente al complejo de preagregación (Deleersnyder *et al.*, 1997).

El dominio amino terminal de la proteína E2 contiene 2 regiones hipervariables llamadas HVR1 y HVR2 las cuales evaden la respuesta inmune y ayudan al mantenimiento de la infección por años (Trujillo-Murillo *et al.*, 2004).

E2 se une con gran afinidad a CD81, una tetraspanina expresada en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo a los hepatocitos. Sin embargo, debido al patrón de expresión de CD81 no explica el hepatotropismo mostrado por el VHC, no obstante, CD81 podría participar en la entrada del VHC. Machida *et al* observaron que la interacción de E2 con CD81 induce hipermutación del gen de la inmunoglobulina en células B, con lo cual se explican los desordenes proliferativos de linfocitos B entre los cuales se incluyen la crioglobulinemia y el linfoma de células B en pacientes con VHC (Machida *et al.*, 2005). Se han propuesto otros receptores para el VHC, entre los cuales se incluyen al receptor de lipoproteínas de baja densidad, L-SIGN y DC-SIGN (Pileri *et al.*, 1998; Bartenschlager *et al.*, 2004).

La proteína p7 esta localizada entre las proteínas estructurales y las no estructurales (Lin C *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994) y es cortada por peptidasas del hospedero (Dubuisson *et al.*, 2002.). La proteína p7 es una proteína pequeña poliproteína de membrana con sus dominios N y C terminal orientados hacia el lumen de Retículo Endoplásmico. No es requerido en la replicación del RNA y su función es incierta. Se ha visto que forma un canal de iones en membranas lipídicas artificiales (Griffin *et al.*, 2003, 2004; Pavlovic *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha reportado que es esencial en la infectividad de VHC en chimpancés (Sakai *et al.*, 2003). Estas observaciones sugieren que la búsqueda de pequeñas moléculas que bloqueen esta actividad podría ser de utilidad en el desarrollo de nuevas drogas anti-VHC.

Dentro de las proteínas no estructurales, se encuentra la proteína NS2, la cual junto con los dominios amino terminal de la proteína NS3, funciona como proteasa responsable de la ruptura de la poli-proteína en la unión NS2/3. También, la proteína NS3 utiliza la proteína NS4a como cofactor para realizar una función serinproteasa, y el dominio carboxi terminal realiza una actividad helicasa (Bartenschlager y Lohmann, 2000).

NS4b es una proteína hidrofóbica de función desconocida. Sin embargo se ha reportado que NS4b es un regulador negativo en el complejo de replicación formado

por NS5b. No es del todo claro como NS4b se une directamente a NS5b, pero se sugiere que NS5a interviene en esta interacción (Lin *et al.*, 1997).

La proteína NS5a aparenta estar involucrada en la resistencia de las células infectadas al efecto antiviral del IFN. Por lo menos para algunos aislados de VHC, es posible la unión de NS5a a la proteína PKR (Yupeng *et al.*, 2001). La capacidad de algunas cepas virales de resistir al IFN ha sido atribuida a la interacción de PKR y NS5a (Francois *et al.*, 2000). El tratamiento con IFN selecciona mutantes resistentes por variaciones en la región carboxi de NS5a (Gale *et al.*, 1997). Además se han realizado estudios en donde se observa que NS5a inhibe apoptosis a través de su interacción con FKBP38 (Wang *et al.*, 2006).

La proteína NS5b tiene una función muy importante como RNA polimerasa dependiente de RNA en la replicación viral (Francois *et al.*, 2000; Lesburg *et al.*, 2000; Rivas-Estilla *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002), la cual fue demostrada en 1996. La secuencia de la proteína NS5b es altamente conservada en pestivirus, flavivirus así como en otros virus de RNA y se cree que se localiza en la región perinuclear formando un complejo de replicación con otras proteínas virales. Esta proteína tiene la estructura típica de una polimerasa con dominios en “forma de mano” rodeando el sitio activo. NS5b interactúa con otras proteínas virales como Core, NS3, NS4a, NS4b y NS5a. Shirota *et al* reportaron que la actividad de NS5b fue estimulada por NS5a in vitro e in vivo (Shirota *et al.*, 2002). Shimakami *et al* reportaron que la interacción entre NS5b y NS5a estimulaba la actividad de NS5b en un sistema de replicones de VHC (Shimakami *et al.*, 2004). Entre las proteínas celulares que interactúan con NS5b se encuentran las proteínas VAMP (Proteína de Membrana Asociada a Vesículas), eIF4AII, hPLIC1, nucleolin, PRK2, α -actinina y la helicasa p68. La interacción de NS5b con estas proteínas puede tener implicaciones en el tráfico celular, transducción de señales y polimerización del RNA para regular los procesos de replicación y transcripción (Jong-Ho *et al.*, 2006). La proteína NS5b es un blanco atractivo en el desarrollo de drogas antivirales debido a que es la RNA polimerasa dependiente de RNA, cuya actividad es esencial en la replicación viral,

además contiene secuencias altamente conservadas y no esta presente en la célula hospedera no infectada (De Francesco *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2001). Hasta el momento, diferentes inhibidores de la polimerasa del VHC han sido reportados. Estos han sido divididos en tres grupos: i) análogos de nucleósidos, ii) inhibidores no nucleósidos, iii) imitadores de pirofosfato.

Una de las características del VHC, es que pose un alto índice de mutación lo cual origina una considerable heterogeneidad genética. Este fenómeno es generado durante la replicación viral, ya que la RNA polimerasa carece de actividad 3'-5' exonucleasa, por lo tanto, no puede eliminar los nucleótidos que han sido añadidos de manera errónea (Neumann *et al.*, 1998). Como resultado, se ha conducido a la aparición de seis genotipos del VHC y de numerosos subtipos, los cuales presentan aparentemente diferente evolución, patogenicidad y respuesta al tratamiento antiviral (Pavio y Lai, 2003).

En el mismo individuo, la replicación a lo largo del tiempo conduce a una mezcla de distintas variantes virales del mismo genotipo (cuasiespecies). Se piensa en una capacidad de mutación rápida como mecanismo de escape del sistema inmune que posibilita la cronicidad de la infección así como la reinfección.

4.5. Replicación

El ciclo de replicación del VHC puede ser resumido como sigue:

1. Penetración a la célula huésped y la liberación del RNA genómico de la partícula viral al citoplasma.
2. Traducción del RNA viral, procesando una poliproteína y la formación de un complejo replicasa asociado con las membranas intracelulares.
3. Utilización del RNA (+) para la síntesis de RNA (-) intermediario.

4. Producción de nuevas cadenas de RNA (+) que pueden ser usadas para síntesis de cadenas negativas, para expresión de la poliproteína, o para el empaquetamiento dentro de la progenie de viriones.
5. Liberación del virus de la célula infectada (figura 4).

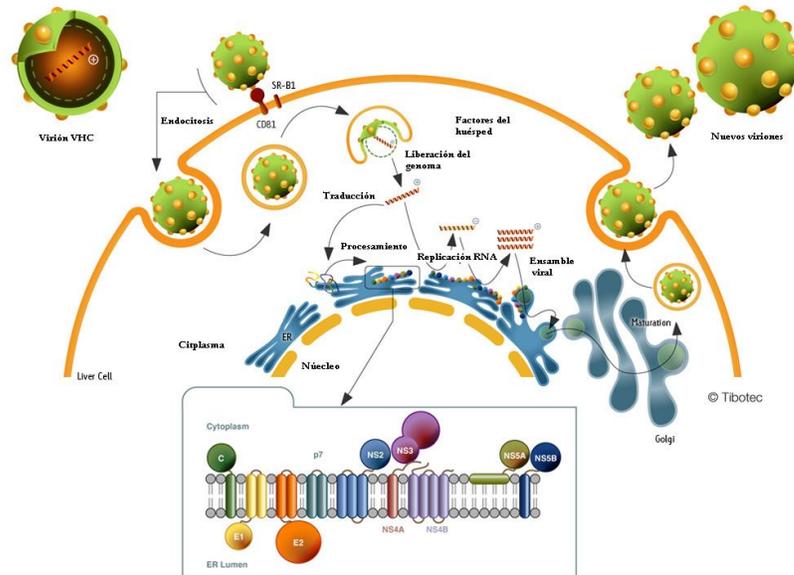


Figura 4. Replicación del VHC.

La formación de partículas puede iniciarse por la interacción de la proteína del core con el RNA genómico. Aunque la proteína del core, *in vitro*, se une al RNA sin especificidad detectable, hay evidencias de unión intracelular preferencial a las secuencias de la mitad 5' del genoma del VHC. Esta unión puede no solo terminar en un empaquetamiento selectivo del genoma positivo, también parece reprimir la traducción del IRES, sugiriendo un mecanismo potencial para pasar de traducción/replicación a ensamblaje.

Las glicoproteínas de envoltura, E1 y E2 son retenidas en el Retículo Endoplásmico durante su síntesis, en donde se lleva a cabo la glicosilación. Posteriormente, ambas glicoproteínas son ensambladas como heterodímeros no covalentes (Op de Beeck *et al.*, 2001; Goofard y Dubuisson, 2003; Zang *et al.*, 2004). La nucleocápside viral adquiere su envoltura de las membranas del Retículo Endoplásmico, y de esta forma es exportada (Sato *et al.*, 1993).

La elevada cinética de replicación viral y la baja fidelidad de la enzima responsable de la replicación (la RNA polimerasa dependiente de RNA) son los dos principales factores que explican la elevada variabilidad genética de este virus. Desafortunadamente no existen modelos experimentales para el cultivo del virus, lo cual dificulta la obtención de datos aunque, siguiendo el modelo propuesto para el VIH, la probabilidad de una mutación puntual será del orden de 10^{-4} y de una mutación doble de 10^{-11} , lo que se traducirá en la producción diaria de, aproximadamente, 3.300 virus distintos al virus parental. De este modo, será fácil comprender que la población que infecta a un individuo es una mezcla muy heterogénea de genomas muy relacionados entre sí, con una homología superior al 98%, y que se denominan cuasiespecies, siendo responsables de la variabilidad intragenoma (Zein, 2000).

4.6. Genotipos

El aislado original (VHC-1) fue un virus RNA monocatenario de sentido positivo con aproximadamente 9400 nucleótidos, una secuencia contenida en el extremo 5' (5' UTR) de 341 nts, un amplio marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de 3,011 aminoácidos y un 3' UTR de 27 bases.

Debido a que de forma natural ocurren variantes del VHC, existen múltiples aislados que difieren entre sí en un 33% de todo el genoma. En la segunda conferencia internacional del VHC y virus relacionados, se propuso un sistema de nomenclatura consenso, en el cual el VHC es clasificado en base a la similitud de secuencia nucleotídica.

Se denominan genotipos a aquellos genomas cuyo grado de homología se encuentra entre el 66-69%; se designan con un número arábigo y, hasta el momento,

se han descrito 6 genotipos mayores. Dentro de un mismo genotipo, cuando el grado de homología se encuentra entre el 77-80% se habla de subtipo; se designan con una letra, que seguirá al número que nombra al genotipo (tabla 1); hasta la fecha se han descrito más de 100 subtipos distintos. Dentro de un mismo subtipo, se denomina aislado a aquellos genomas en los que el grado de homología no es superior al 91-95%. Aún en un mismo paciente, el VHC no existe como una sola entidad, sino como una mezcla de micro-variantes de una secuencia maestra predominante, llamadas cuasiespecies, estas resultan de la acumulación de mutaciones durante la replicación viral en el huésped (Holland *et al.*, 1992; Zein, 2003).

Tabla I.
Homología y nomenclatura de las variantes del VHC.

Categorías	Homología (%)
Genotipo	66-69
Subtipo	77-80
Aislado	91-95
Cuasiespecie	>98

4.6.1. Distribución Geográfica de los Genotipos

Al menos 6 genotipos mayores del VHC, cada uno comprendiendo múltiples subtipos, han sido identificados a lo ancho del mundo. Aunque los genotipos 1, 2 y 3 parecen tener una distribución mundial, su prevalencia relativa varía en diferentes áreas geográficas.

Algunos genotipos como el 1a, 2a y 2b están ampliamente distribuidos a lo largo del mundo, y otros como el 5a y 6a están confinados a áreas geográficas específicas (figura 5). El genotipo 1b es más común en el sur y este que en el norte de Europa y

Estados Unidos (Fretz *et al.*, 1995; Rapicetta *et al.*, 1998). El genotipo 4 es predominante en Medio Oriente así como en el norte y centro de África. El genotipo 5a es usualmente localizado en el sur de África; en el este de África los genotipos predominantes son el 1 y 2 con una gran diversidad de subtipos (Mellor *et al.*, 1995; Ruggieri *et al.*, 1996; Jeannel *et al.*, 1998). En Japón, Taiwán y en algunas partes de China, los genotipos comunes son 1b, 2a y 2b. El genotipo con la distribución geográfica mas restringida es el 6a localizado en Hong Kong (Addams *et al.*, 1997).

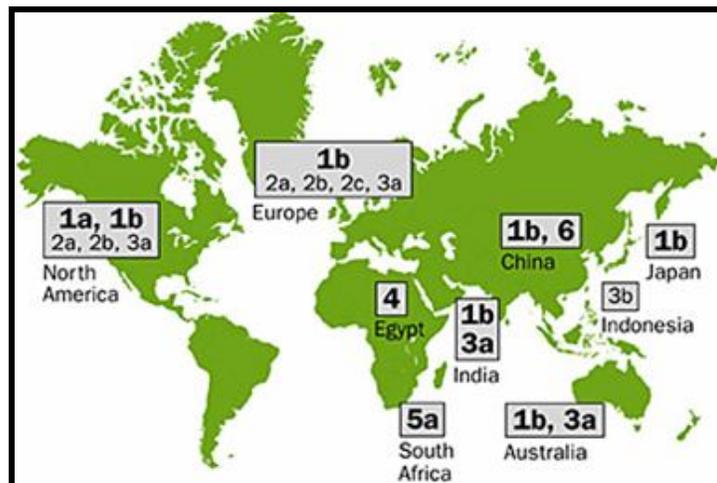


Figura 5. Distribución de los genotipos del VHC a nivel mundial.

En los pacientes con infección crónica por VHC con genotipo 1b se ha reportado una hepatopatía más severa y un curso más agresivo de la enfermedad, que con otros genotipos. Además es significativamente más prevalente entre pacientes con cirrosis hepática, aquellos con hepatopatía descompensada que requieren transplante hepático, y aquellos con hepatitis C crónica activa, así como en la mayoría de los pacientes con carcinoma hepatocelular asociado al VHC. En los receptores de transplantes hepáticos, el genotipo 1b está asociado con recurrencia temprana y hepatitis más severa que otros genotipos.

Los pacientes con genotipo 1b y en menor grado 1a, tienen una respuesta al tratamiento con interferón menos favorable que aquellos infectados con genotipo 2 ó 3 (Zein, 2003). Este hecho es de suma importancia para nuestro país, pues el genotipo

1b es el más frecuente, al encontrarse en más del 60% de las personas infectadas con VHC. (Rivas Estilla *et al.*, 1998).

4.7. Respuesta Inmune

La hepatitis C crónica no es consecuencia directa de la destrucción de células hepáticas por el virus. Más bien, es el resultado de la respuesta inmune del huésped, la cual es lo suficientemente prolongada para inducir destrucción en células hepáticas y provocar una fibrosis, aunque por otra parte no es suficiente para erradicar al virus de sus reservorios (Heydtmann *et al.*, 2001; Thierry *et al.*, 2003).

La respuesta inmune es mediada por los linfocitos T citotóxicos (CTL) y cooperadores. Sin embargo las células T CD8+ en los pacientes con hepatitis crónica C poseen una menor capacidad de proliferación y producen menos IFN en respuesta a los antígenos de VHC. Por lo cual las células T CD8+ están involucradas en inducir inflamación en hígado, sin embargo su ineficiencia solo causa daño a los hepatocitos sin lograr erradicar el VHC (Kanto y Hayashi, 2006).

La heterogeneidad del VHC puede ser importante en el escape de la inmunidad inducida por CTL, también ha hecho aún más difícil el desarrollo de una vacuna (Zein, 2003).

4.8. Tratamientos para Combatir la Hepatitis C

El tratamiento con interferón (IFN) fue el primero en mostrar efectos positivos en pacientes con hepatitis C crónica en el año de 1986, antes de la identificación del

VHC. El interferón alfa es una citocina que tiene un importante papel en la respuesta inmune innata antiviral. El mecanismo de acción del interferón comienza al unirse a receptores presentes en la superficie celular que activan el sistema Janus Kinasa el cual induce la transcripción de los elementos de respuesta estimulados por interferón (ISREs) codificando una serie de proteínas que alteran el metabolismo celular e interfieren con la replicación viral, la síntesis de proteínas y su ensamble (Hoofnagle y Seef, 2006). Sin embargo su uso tuvo un éxito limitado ya que solo logró una pérdida sustancial de solo el 16-20 %. Un avance fue el uso del IFN en combinación con la ribavirina con lo cual se logró una respuesta sostenida de alrededor 35-40%. Posteriormente el desarrollo del interferón pegilado, en el cual una larga cadena de polietilenglicol (PEG) se une covalentemente al IFN dio como resultado una molécula activa con una vida larga, con lo cual se mejoró la respuesta antiviral del IFN. Además, en combinación con la ribavirina, se obtuvo una respuesta sostenida de 54-56% (Feld y Hoofnagle, 2005).

No obstante, la alta heterogeneidad genética del VHC limita la eficiencia del interferón como tratamiento antiviral; además de ser caro y frecuentemente poco tolerado (McHutchison y Patel, 2002).

No hay tratamiento disponible para pacientes que no muestran respuesta a la monoterapia o a la terapia combinada. El trasplante hepático está disponible sólo para pacientes con cirrosis descompensada y en pacientes con hepatocarcinoma en etapas iniciales. La reinfección del trasplante con VHC es inevitable (Lauer y Walker, 2001).

Por esta razón, es necesario el desarrollo de antivirales mas efectivos que puedan ser utilizados en pacientes infectados con los subtipos más resistentes (Trujillo-Murillo *et al.*, 2004). Es por ello que surge la necesidad de encontrar diversos puntos de ataque para limitar el escape viral.

4.9. Terapia Génica

La terapia génica es una alternativa promisoriosa en éste padecimiento lo cual ha sido demostrado en los numerosos reportes que evocan éxito en el bloqueo de la expresión y replicación del VHC, así como la especificidad de la terapia.

Por muchos años, el enfoque tradicional para estudiar los mecanismos de replicación del VHC fueron inaccesibles debido a las limitaciones de propagar el virus en líneas celulares. Lohmann y col. desarrollaron un sistema de replicones subgenómicos del VHC en la línea celular de hepatoma humano Huh-7 que ha contribuido en el desarrollo de estudios moleculares sobre la replicación e inhibición del VHC (figura 6). En este sistema la región que codifica para las proteínas estructurales fue remplazada por el gen de la neomicina fosfotransferasa II (NPTII), cuya expresión es dirigida por el IRES del VHC y la región que codifica para las proteínas no estructurales es dirigida por el IRES del virus EMCV (Rivas-Estilla et al., 2002).

Inicialmente se construyeron replicones que expresaban solo proteínas no estructurales, pero en años recientes se han construido replicones que expresan la poliproteína completa del VHC (Randall *et al.*, 2003).

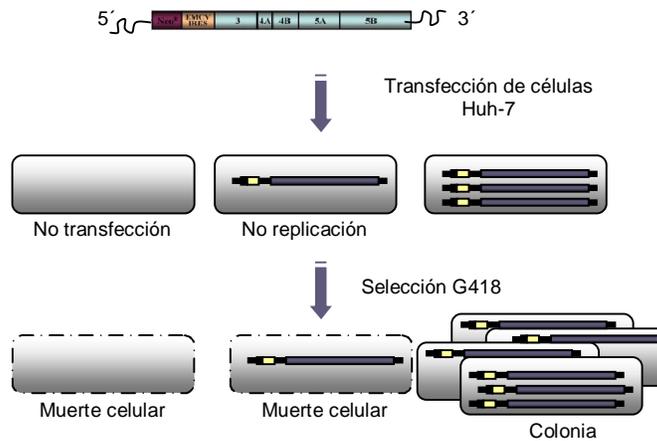


Figura 6. Modelo de replicones subgenómicos del VHC en células hepáticas. El plásmido que contiene el replicón fue transcrito in vitro. Posteriormente, las células Huh-7 fueron transfectadas con los replicones. Luego se hizo una selección con el fármaco geneticina (G-418) donde solo las células que expresan el replicón son las que crecerán en presencia de G-418 debido a que NPT-II bloquea el efecto tóxico del fármaco.

4.9.1. Oligonucleótidos Antisentido

Los oligonucleótidos antisentido usualmente consisten en 15-20 nucleótidos, los cuales son complementarios a un RNA blanco. Son dos los mecanismos que contribuyen a su actividad antisentido. La primera es la mediada por la actividad RNasa H, y la segunda es mediante el bloqueo de la transcripción.

Muchos oligonucleótidos han sido diseñados para ligarse al IRES del VHC, y han reducido efectivamente la traducción del RNA “in vitro” en sistemas modelo de expresión génica. ISIS-14803 es un oligonucleótido de 20 bases fosforotioado que es complementario al codón de inicio de la traducción que reside en el IRES del VHC, y está en estudios de evaluación en fase II/III. Mostrando, en pacientes infectados con el genotipo 1 que no respondieron a la terapia con interferón, buena tolerancia y

reducciones de los niveles de RNA del VHC mayores de 1.0 log₁₀ unidades en algunos de ellos (Soler *et al.*, 2004).

4.9.2. Ribozimas

Las ribozimas son RNA's catalíticos que cortan moléculas de RNA de forma específica, mediante una secuencia guía interna que le permite unirse a secuencias complementarias (antisentido), una propiedad que les permite actuar como potentes antivirales y agentes anticáncer, además de ser una poderosa herramienta en estudios donde se desea evaluar la funcionalidad genómica (Khan, 2006).

Recientemente las ribozimas han sido utilizadas exitosamente para inhibir la expresión génica en una gran variedad de sistemas “in vitro” e “in vivo”. Ya se han iniciado ensayos clínicos de fase I utilizando ribozimas en pacientes con SIDA (Khan, 2006).

4.9.3. RNA de Interferencia

La interferencia del RNA es un mecanismo biológico que de manera natural inhibe la expresión génica mediante la degradación de los transcritos del RNA blanco (Rychahou *et al.*, 2006). Fire *et al* en 1998 encontraron que moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA) funcionaban como mediadores de un silenciamiento génico en *C. elegans*. Posteriormente se demostró que este silenciamiento específico de genes podía ser inducido en una gran variedad de organismos incluyendo la mayoría de los organismos eucarióticos (Fire *et al.*, 1998).

La interferencia del RNA también conocido como silenciamiento génico posttranscripcional, es un proceso que implica RNA bicatenarios (dsRNA) mediante el silenciamiento de la expresión génica de una manera específica de secuencia. La maquinaria del RNAi usa duplex de RNA como guías que localizan, se unen y bloquean RNA's específicos celulares o virales.

Entre las funciones biológicas del RNA de interferencia se encuentran: silenciamiento genético, defensa antiviral, regulación de genes y la eliminación de aberraciones o secuencias repetitivas.

El dsRNA inicial es cortado en pequeños RNAs de interferencia (siRNA), de 21 a 25 nucleótidos de largo, mediante un complejo de proteínas llamadas Dicer, este complejo involucra a la RNA polimerasa III (figura 7). Los siRNA son incorporados a un complejo de inducción del silenciamiento de RNA (RISC) y actuarán como guías para dirigir la maquinaria de degradación de RNA hacia los RNAs blanco. Esta maquinaria parece capaz de amplificar la señal de degradación (Mittal, 2004).

No obstante, en células de mamífero la introducción de dsRNA conlleva a la activación de la respuesta del interferón generando la muerte celular a través de apoptosis (figura 7). El mecanismo de acción del interferón se activa en presencia de RNA de doble cadena de más de 30 nucleótidos de longitud (nt). Esto induce la degradación no específica de todos los RNAm celulares por medio de la activación de 2'-5'oligoadenilato sintetasa en RNAsa L. Así mismo el interferón excita a la proteína cinasa PKR, la cual fosforila e inactiva el factor de iniciación eucariótica (eIF2 α) inhibiendo la traducción de los RNAm y por consiguiente la síntesis de proteínas (Ichim *et al.*, 2004; Hernández-García, 2005). El problema de degradación inespecífica de los RNAm celulares generada por la introducción de dsRNA ha sido recientemente solucionado mediante la utilización de siRNA sintéticos que son lo suficientemente largos para mediar la supresión génica específica, pero que por su corto tamaño (21-23 pb) evaden los efectos adversos de los dsRNA (Elbashir *et al.*, 2006; Shlomai y Shaul, 2004).

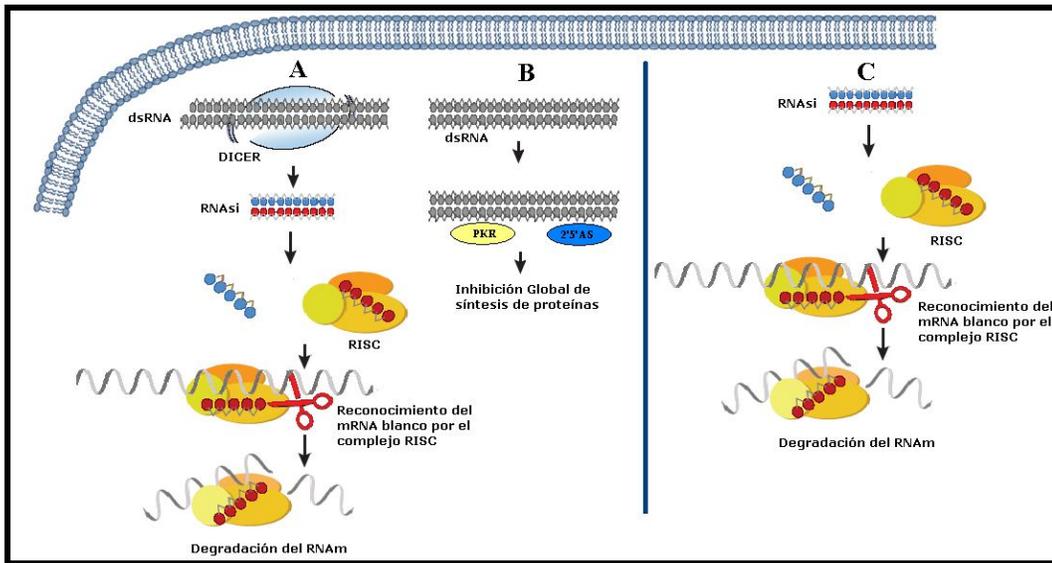


Figura 7. Mecanismo de acción del RNA de interferencia. A) En presencia de un dsRNA, un mecanismo de defensa innato es activado causando el corte de la dsRNA por la endonucleasa Dicer tipo III. Esta endonucleasa subsecuentemente corta el dsRNA en fragmentos cortos de RNA de doble cadena de 21 nucleótidos (siRNA). Estos fragmentos inician el ensamblaje del complejo RISC e inducen el corte de los transcritos de RNAm con secuencia homologa. B) Sin embargo, en células de mamífero, las cadenas de dsRNA activa al 2'5'oligosintetasa, la cual induce una respuesta con interferón no específica provocando un apagado general en la síntesis de proteínas. C) La introducción en células de mamífero de segmentos cortos de RNA de doble cadena (siRNA) de 21 nucleótidos no son reconocidos por la enzima Dicer ni por la 2'5'oligosintetasa, uniéndose directamente con el complejo RISC e induciendo el silenciamiento específico de transcritos complementarios; sin inducir una respuesta inespecífica al no activar a interferón.

El siRNA ofrece un potencial terapéutico para silenciar genes causantes de enfermedades en forma distinta al mecanismo de los terapéuticos convencionales. El RNAi amplía las perspectivas terapéuticas para inhibir la expresión génica con mayores ventajas que los inhibidores químicos, al tener una alta especificidad y por consiguiente una mayor eficiencia y menor toxicidad que las drogas convencionales. (Rychahou *et al.*, 2006).

Hay reportes de la inhibición de la producción de virus mamíferos como VIH, virus del sarcoma de Rous, virus respiratorio sincitial, poliovirus, virus del dengue, FHV, VPH, y VHC mediante la tecnología del siRNA (Kiyosawa *et al.*, 1990; Gitlin y Andino, 2003).

La replicación del VHC genera dsRNA y se puede activar el mecanismo de RNAi de forma natural, la cual corresponde a una defensa innata del huésped en contra de la infección viral (Randall *et al.*, 2003).

Estudios recientes revelan el potencial del RNAi para ser utilizado contra las hepatitis A, B, C y delta (Randall *et al.*, 2003).

4.9.3.1 siRNA como Terapia Génica.

Debido a su peso molecular (~13 kDa) y a su naturaleza polianiónica (~40 cargas negativas), el siRNA desnudo no puede atravesar libremente la membrana celular, por lo tanto se requieren sistemas que faciliten su acceso a los sitios intracelulares para poder llevar a cabo su acción. Se conoce extensamente que la introducción intracelular eficiente del siRNA a su sitio blanco en el cuerpo y la administración sistémica son los mayores obstáculos para el uso del RNAi en forma clínica (Akhtar y Benter, 2007).

Existen diversos desafíos que debe superar el RNAi antes de ser utilizado como agente terapéutico (figura 8), entre los cuales destacan:

- 1) Diseño efectivo. El siRNA debe ser diseñado eficientemente. Uno de los mayores determinantes de funcionalidad, es la estructura secundaria de las regiones adyacentes al sitio blanco. El siRNA que tiene como blanco regiones con muchas estructuras secundarias tiene menor eficiencia que aquellos blancos menos estructurados. Además, RISC al asociarse con el siRNA, debe incorporar preferencialmente la cadena complementaria a la secuencia blanco, de lo contrario resultaría inhabilitado para localizar el RNAm blanco (Vickers *et al.*, 2003). Por ello, no todas las secuencias complementarias al RNAm

blanco son efectivas y las combinaciones realizadas con algoritmos computacionales deben ser probadas para definir su potencial (Federov *et al.*, 2005; Akhtar y Benter, 2007; Hollins *et al.*, 2007).

- 2) Estabilidad biológica. El siRNA desnudo, sin modificaciones, es relativamente inestable en sangre y suero, por lo que es rápidamente degradado por endo y exonucleasas, lo que significa que tiene una vida corta in vivo. Se ha visto que modificaciones químicas pueden ser introducidas en la estructura duplex de RNA para aumentar la estabilidad biológica sin afectar su actividad de silenciamiento génico. Alternativamente, se puede formular un sistema que no solo aumente su absorción por parte de la célula, sino que también produzca una estabilidad biológica. Modificaciones químicas en los azúcares, en las bases o el esqueleto del RNA se han utilizado para aumentar la estabilidad y eficiencia del siRNA (Bumcrot *et al.*, 2006). De esta manera, la degradación del siRNA en suero y/o en las células puede demorarse de unos minutos a horas, y junto con un sistema apropiado de liberación, la actividad de silenciamiento génico puede sostenerse por varios días (Bumcrot *et al.*, 2006).
- 3) Formulación con un sistema de liberación. Es considerado el mayor obstáculo a vencer para poder utilizar el RNAi en forma terapéutica. Además de seleccionar y formular un siRNA, se debe contar con un sistema de liberación biocompatible y “genocompatible” que mejore su estabilidad biológica, su farmacocinética y su ingreso a la célula blanco. El sistema de liberación puede además alterar la farmacocinética de los siRNAs al modificar su tamaño molecular y reducir su excreción por los riñones, con lo cual se prolongaría su vida media “in vivo”. Los sistemas con blancos celulares dirigidos mediante el uso de receptores específicos en la superficie celular es una probabilidad real. Una vez dentro de la célula, el siRNA tendría que escapar a la compartimentización de organelos como endosomas y lisosomas e interactuar con su RNAm blanco en el citosol para tener un efecto potente y una actividad de silenciamiento secuencia-específica (Akhtar y Benter, 2007).

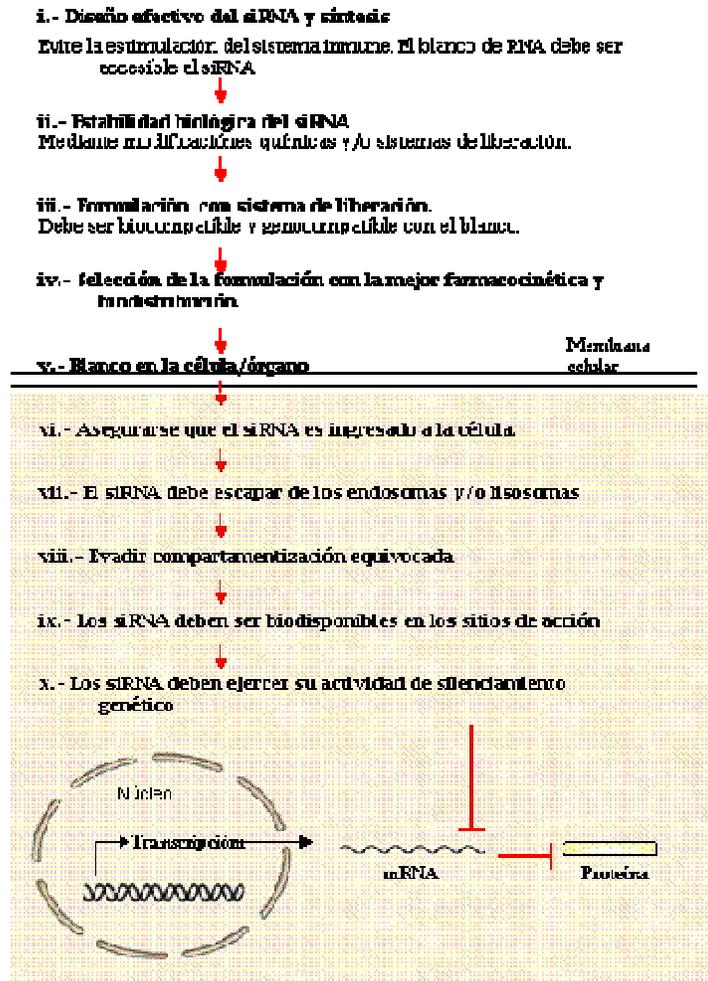


Figura 8. Desafíos que debe superar el RNAi antes de ser utilizado como agente terapéutico. Los cambios para un efectivo sistema de silenciamiento in vivo implican un efectivo diseño y selección de las mejores secuencias, modificaciones químicas, sistemas de liberación que promuevan la estabilidad biológica (pasos i-iv). Además debe ser eficientemente ingresada a la célula blanco y escapar de compartimentos intracelulares para poder tener una correcta actividad de silenciamiento (pasos v-x)

4.9.3.2. Estrategias del siRNA “in vivo”.

Es importante que el siRNA exógeno administrado se acumule en los órganos y tejidos blanco y ejerzan su acción pero con un mínimo daño en los tejidos no blanco. (Akhtar y Benter, 2007).

La ruta de administración es un recurso importante. La administración sistémica de ácidos nucleicos desnudos genera su acumulación en los órganos del Sistema Reticuloendotelial (RES) como el hígado, pulmón, bazo y riñones (Braasch, 2004; Santel *et al.*, 2006; Van de Water *et al.*, 2006). Estudios muestran la acumulación de siRNA desnudos en los riñones de los ratones y son detectados en orina a los 5 minutos después de la inyección intravenosa (Santel *et al.*, 2006; Van de Water *et al.*, 2006).

El uso del siRNA junto con un conjugado como el polietilenglicol (pegilación) o en complejos como lípidos o polímeros previene su excreción en la orina, y esta construcción excede al peso y tamaño molecular de la filtración glomerular. Este tipo de sistemas parecen ser importantes al definir la farmacocinética y la biodistribución en dosis máximas toleradas.

El hígado fue el primer órgano blanco tratado exitosamente con siRNA. Diseños de siRNA específicos contra el virus de la hepatitis C, silenciaron la expresión de un plásmido con secuencias de hepatitis C colocados en el hígado del ratón (Randall *et al.*, 2003).

4.9.3.3. siRNA como Terapia Génica contra la Infección por VHC.

Debido a que el genoma del VHC esta conformado por una cadena de RNA de polaridad positiva, la cual funciona como RNA mensajero y como templado en la replicación viral; la destrucción del RNA del VHC podría bloquear no solo la síntesis

proteica, sino la replicación viral; por lo cual, es particularmente atractivo el tratamiento con RNAi.

A través de diversos estudios se ha demostrado recientemente la sensibilidad del VHC al siRNA en células Huh-7 que expresan de manera constitutiva un replicón subgenómico del VHC (Yokota *et al.*, 2003; Kapadia *et al.*, 2003; Randall *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Prabhu *et al.*, 2005; Korf *et al.*, 2005). La introducción de siRNA contra la región 5'UTR o la región de la luciferasa del replicón del VHC, resultó en una reducción del 85 y 90% en los niveles de luciferasa respectivamente (Seo *et al.*, 2003). En otro trabajo, utilizando también la región 5'UTR, se lograron inhibiciones de hasta un 80% con concentraciones de tan solo 2.5 nM del siRNA (Yokota *et al.*, 2003). En un sistema similar, Kapadia *et al* demostraron la inhibición de la replicación viral a los 2 días de transfección con siRNAs dirigidos contra las regiones NS3 y NS5b, permaneciendo por al menos 6 días. Además, demostraron que dicho efecto fue independiente de interferón y que el ciclo celular no fue afectado por el siRNA (Kapadia *et al.*, 2003). Resultados similares fueron los obtenidos por Randall *et al* en donde se logró una eliminación viral de hasta el 98%, al utilizar siRNA dirigidos contra las regiones del Core, NS5b y NS4b (Randall *et al.*, 2003).

Por lo general se ha evaluado la inhibición del VHC con RNAi en regiones que son altamente conservadas como NS5b y la región 5'UTR. Sin embargo, también se han realizado estudios con siRNAs dirigidos contra regiones relativamente variables como el Core y E2. Liu *et al* utilizaron células HEK 293T (línea celular de riñón de embriones humanos) las cuales contenían plásmidos que expresaban las proteínas del Core y E2, y posteriormente las transfectaron con siRNAs dirigidos contra estas dos regiones. Los resultados muestran una disminución en los niveles de proteínas y de hasta 21 veces en los transcritos virales (Liu *et al.*, 2006). No obstante, para tener una mayor relevancia a nivel terapéutico, regiones altamente conservadas del VHC deben ser elegidas como blanco, con la finalidad de minimizar la aparición de mutantes que escapen al siRNA seleccionado.

Una estrategia alternativa para el tratamiento antiviral por RNAi es el utilizar genes celulares como blanco, cuyos productos son requeridos en la replicación viral. Por ejemplo el silenciamiento de PSMA7 (Proteosoma Alfa Subunidad 7), HuR (Hu Antígeno R) y secuencias conservadas del virus, da como resultado una inhibición adicional del VHC al utilizar de manera conjunta estos siRNA comparado con su efecto al ser utilizado de manera individual (Korf *et al.*, 2005).

Reportes recientes hablan sobre la introducción de vectores de DNA que codifican los siRNA contra el VHC. Prabhu *et al* lograron inhibir eficientemente la replicación y expresión del VHC al introducir plásmidos que expresaban siRNA dirigidos contra las regiones E2, NS3 y NS5b en un sistema celular que expresaba la secuencia completa del VHC (Prabhu *et al.*, 2005). Estos avances aumentan la posibilidad de utilizar el RNAi contra el VHC en forma terapéutica.

Para determinar la evasión al mecanismo del siRNA por parte de alguna de las proteínas del VHC, el siRNA ha sido evaluado en células transfectadas con el replicón genómico completo del VHC, el cual expresa las proteínas estructurales y la proteasa NS2. Los resultados confirman que los replicones subgenómicos no son más susceptibles al siRNA que los replicones genómicos completos, con lo cual se descarta un posible mecanismo anti-RNAi por parte del VHC (Randall *et al.*, 2003).

Konishi *et al* realizaron transfecciones en forma de un siRNA seleccionado continua por un periodo de 4 semanas, originando mutaciones en las secuencias del RNA seleccionado como blanco y demostrando además que dichas mutaciones le confirieron resistencia a posteriores transfecciones con el siRNA (Konishi *et al.*, 2006).

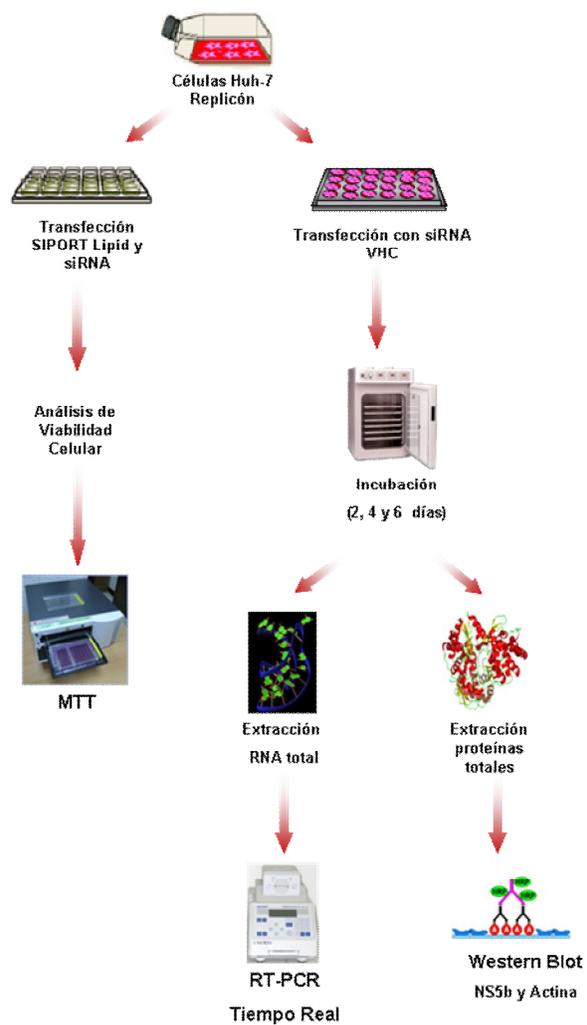
Por otra parte, Wilson y Richardson reportan en el 2005, que después de varios tratamientos con siRNAs altamente efectivos en cultivos celulares con replicones del

VHC se generaban replicones resistentes a los tratamientos subsiguientes y que el uso de combinaciones de dos siRNAs juntos limitaba el escape viral debido a mutaciones. Esto sugiere que la actividad del RNAi puede usarse como tratamiento contra el VHC y que el uso de múltiples siRNAs podría prevenir la emergencia de virus resistentes (Wilson y Richardson, 2005).

La emergencia de mutantes virales de escape parece ocurrir dado el alto índice de mutación del RNA viral. Esto puede prevenirse mediante el uso de múltiples siRNA dirigidos contra diferentes regiones conservadas del genoma del VHC como la región no codificante 5' UTR (Randall *et al.*, 2003).

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño Experimental



ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2. Cultivo Celular.

5.2.1. Mantenimiento

La línea celular de hepatoma humano, Huh-7 que expresa constitutivamente el replicón del VHC, se propagó en cajas de 75cm³ en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico (100U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin), 1% de aminoácidos no esenciales y además se le agregó 500 µg/ml de geneticina (G-418) por mililitro de medio. Las células se mantuvieron a una temperatura de 37° C y en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂.

5.2.2. Pase Celular

Al observarse un 80 % de confluencia, se realizaron los pases a cajas de 75cm³, se les adicionó 3 ml de tripsina 10X y se dejaron incubar por aproximadamente 15 minutos. Se retiró la tripsina y se centrifugó a 2500 rpm durante 7 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 ml de medio. El volumen de medio suplementado con las células resuspendidas agregado a la nueva caja fue de 7 mililitros.

5.2.3. Conteo de Células

Se colocaron en un tubo eppendorf 60µl de medio DMEM, 10 µl de Azul Tripiano junto con 10µl de la suspensión celular y se depositaron 10µl en una cámara de

Neubauer. Se contaron en cuatro cuadrantes, y se obtuvo el promedio el cual se multiplicó por 10^4 , y el factor de dilución 8.

5.3. Generación de siRNA

Las secuencias blanco de los siRNA fueron determinadas utilizando los criterios de la base de datos de Ambion, seguido por la generación de siRNA específicos para el VHC, utilizando el Silencer siRNA Constructor Kit (Ambion, Austin TX).

Secuencias de los siRNAs

Tabla II.
Tabla de secuencias de los siRNAs sintetizadas por Ambion

siRNA	Secuencias	% G-C
A	Sentido GGCGUCCACAGUUAAGGCUtt Antisentido AGCCUUAACUGUGGACGCCtt	52%
B	Sentido GGCUAAACUUCUAUCCGUGtt Antisentido CACGGAUAGAAGUUUAGCCtt	43%
C	Sentido GGACCAAGCUCAAACUCACtt Antisentido GUGAGUUUGAGCUUGGUCCtt	48%

5.4. Transfección

5.4.1. Transfecciones para Extracción de Proteínas.

Las células fueron cultivadas en 2 ml de medio en placas de 6 pozos con una densidad de 80,000 células por pozo. Después de 24 horas de adherencia, se realizó la dilución del agente de transfección y se dejó incubar por 20 minutos. Posteriormente se mezcló con el siRNA con la concentración requerida y se incubó durante 15 minutos. Posteriormente se adicionaron a los pozos correspondientes y se incubaron a 37° C y 5% de CO₂

5.4.2. Transfecciones para Extracción de RNA

Las células fueron cultivadas en 500 µl de medio en placas de 24 pozos con una densidad de 30,000 células por pozo. Después de 24 horas de adherencia se realizó la dilución del agente de transfección y se dejó incubar por 20 minutos. Posteriormente se mezcló con el siRNA con la concentración correspondiente y se incubó durante 15 minutos. Posteriormente se adicionaron a los pozos correspondientes y se incubaron a 37° C y 5% de CO₂

5. 5. Extracción de Proteínas

Se obtuvieron los extractos proteicos de los ensayos realizados con siRNA. Después del ensayo, se removió el medio de cultivo y se adicionó PBS 1X+EDTA 1mM. Se desprendió la monocapa de los pozos con ayuda de un “scraper” y se colocó en un tubo eppendorf, se centrifugó a 4° C por 1 minuto. Se le agregó buffer de Lisis Completo (ver apéndice) y se incubó en hielo por 20 minutos. Se centrifugó

a13000 rpm. durante 5 minutos a 4° C y se colectó el sobrenadante, el cual fue almacenado a -70° C hasta su análisis.

I) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

a) Preparación de la curva estándar

- Se preparó en agua estéril una solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a una concentración de 100 mg/ml.
- Se hizo una dilución de 1:50 del stock de 100 mg/ml, para que quedara a una concentración final de 2 mg/ml ó 2 µg/µl.
- Se prepararon directamente en las celdas de plástico los estándares (ver apéndice) empleando el stock diluido de BSA.
- Se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford concentrado a cada celda y se mezcló.
- Se midió la absorbancia a 595 nm en el biofotómetro (Eppendorf).

b) Preparación de la muestra

- Para determinar la concentración de proteínas en la muestra problema se colocaron 2 µl del extracto de proteínas más 798 µl de agua. Se adicionaron 200µl del Reactivo de Bradford y se tomó lectura en el biofotómetro en el cual se realizó la curva estándar previamente. La concentración de proteínas leída por el aparato se dividió entre dos, debido a que se colocaron 2 µl de extracto de proteínas de la muestra.

5.6. Western blot

Para determinar los niveles de las proteínas virales expresadas en la línea celular Huh-7 se realizaron ensayos de Western blot.

5.6.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó la electroforesis con 50 µg de proteína total, la cual se desnaturizó en buffer de carga (4% SDS, 20% Glicerol, 0.2% azul de bromofenol, 200mM b-mercaptoentanol, 100mM Tris-HCl pH 6.8) a 94° C por 5 minutos.

Se armó el cassette para el gel de la electroforesis vertical. Se preparó la solución del gel separador, con una concentración del 10% (ver apéndice) y se colocó en el cassette, después se cubrió el gel con isopropanol absoluto por aproximadamente 10 minutos. Se invirtió el gel para remover el exceso de isopropanol. Se preparó la solución del gel concentrador al 5% (ver apéndice) y se colocó en el cassette hasta el límite del vidrio e inmediatamente se acomodó el peine. Se colocó el gel en la cámara de corrimiento y se añadió el buffer de corrida 1X. Se retiró el peine y se lavaron los pocillos con buffer de corrimiento para eliminar la acrilamida no polimerizada. Se cargaron las muestras y se corrió la electroforesis por aproximadamente 2 horas a 80 Volts.

5.6.2. Transferencia a Membrana de Nitrocelulosa

Se utilizó un bastidor GIBCO para la transferencia de las proteínas. Se cortó una membrana de nitrocelulosa de 6 cm X 8.5 cm aproximadamente. Se lavó con agua destilada por 5 minutos y se colocó en buffer de transferencia 1X (ver apéndice)

durante 10 minutos. También se colocó en buffer de transferencia 1X dos piezas de papel filtro y 4 esponjas. Del gel de la electroforesis se eliminó el gel concentrador y se colocó sobre el papel filtro húmedo y se despegó el gel separador del vidrio. Se colocaron dos esponjas, el papel filtro y el gel sobre el set de transferencia. Se armó un “sándwich” colocando sobre el gel de la membrana previamente equilibrada. Se colocaron sobre la membrana el papel filtro húmedo y se eliminaron las burbujas formadas entre el gel y la membrana y se colocaron dos esponjas húmedas. La secuencia de transferencia fue en dirección de polos negativo a positivo (Esponjas – papel filtro – gel de poliacrilamida – membrana de nitrocelulosa – papel filtro – esponjas). Se colocaron en un buffer de transferencia (ver apéndice) y se corrió en la cámara de transferencia a 35 V por hora y media.



Figura 9. Representación gráfica de la transferencia de las proteínas en dirección de polo negativo a positivo.

5.6.3. Inmunodetección

Se colocó rojo de Ponceau a la membrana a fin de observar si se realizó de manera correcta la transferencia. Se lavó con buffer TBS-Tween 2 veces durante 5 minutos. Se colocó la membrana de nitrocelulosa en la solución de buffer de bloqueo durante 1 hora a T.A. Posteriormente se colocó la membrana con la dilución del primer anticuerpo de cabra contra NS5b y actina (dilución 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y se incubó toda la noche a 4° C. Se lavó 3 veces con el buffer de lavado por 10

minutos a T.A. Se colocó el anticuerpo conjugado HRP-conejo anti cabra (dilución 1:1000 ZYMED Laboratorios San Francisco CA USA), el cual se dejó incubar durante dos horas a T.A. y se lavó tres veces con buffer de lavado durante 10 minutos a T.A. Se escurrió la membrana, se agregó en partes iguales el reactivo A y B del kit de quimioluminiscencia (Roche) y se mantuvo en agitación durante 5 minutos. Se escurrió la membrana para eliminar el exceso de solución y se colocó la membrana con las proteínas hacia el plástico y se eliminaron las burbujas. Se colocó la membrana con el plástico en el chasis y se expuso la membrana en el cuarto oscuro a un film el tiempo necesario. El análisis densitométrico de las bandas de proteínas detectadas por Western blot se llevó a cabo con el software Phoretix 1D v2003.02

5.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa

5.7.1. Extracción RNA

Se realizó en células Huh-7-VHC transfectadas con siRNA, en placas de 24 pozos. I. Se adicionó 0.5 ml de trizol por pozo. Posteriormente el lisado celular se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. y se incubó 5 min. a T.A. Se añadieron 100µl de cloroformo y se mezclaron por inversión 15 segundos. Se incubó en hielo de 2 a 3 minutos y se centrifugó a 13000 rpm. durante 15 minutos a 4° C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 250µl de isopropanol e incubó a -70° C por 15 minutos. Después se centrifugó a 13000 rpm. por 10 minutos a 4° C, se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 250µl de etanol al 70%. Se mezcló y centrifugó por 5 min. a 4° C. Se secó la pastilla por 5 minutos y se resuspendió en agua DEPC.

5.7.2. RT-PCR

La RT-PCR se realizó de la siguiente manera:

Se utilizó el kit de Applied Biosystem High-Capacity cDNA Archive Kit para las Transcripciones reversas de los RNAs obtenidos de los ensayos con el siRNA en placas de 24 pozos. Se preparó una mezcla con 2µl del Buffer RT 10X, 0.8 µl de dNTPs Mix (100 mM), 2µl de Random Primers 10 X, 1 µl de MultiScribe RT 50U/µl y 4.2 µl de H₂O. Además se realizó una dilución del RNA extraído 1:10. Se mezclaron los 10µl del mix y 10 µl de la dilución para dar un volumen total de 20 µl. Se incubó a 25° C por 10 minutos seguido de un periodo de incubación de 2 horas a 37°C.

5.7.3. PCR Tiempo Real

Se utilizó PCR Tiempo Real para la cuantificación de RNA del VHC utilizando el iCycler (BIORAD). Las amplificaciones fueron realizadas por triplicado utilizando los primers marcados con 6-carboxyfluoresceina (6FAM), Prueba VHC 5'-6FAM-CTGCACGACACTCATAC-TAMRA-3' VHC replicón RNA Forward, 5'-GCGTCTAGCCATGGCGTTA-3'; VHC replicón RNA Reverse, 5'-GGTTCCGCAGACCACTATGG-3'.

Para la cuantificación de GAPDH, se utilizó el ensayo GAPDH 20X (Applied Biosystem número de parte 4326317E).

Las condiciones fueron de 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos y 60° C por 60 segundos (ver tabla III). 200 nanogramos de cDNA se utilizaron para la amplificación por PCR y se llevaron a cabo por triplicado. Para cada reacción se colocaron 10µl del Taqman Universal PCR Master Mix, 1µl de la sonda y 9µl de cDNA diluido en agua libre de RNAsas.

Mediante la expresión de GAPDH se normalizó la concentración de RNA para cada muestra. Se realizó una cuantificación relativa por el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak).

Tabla III.
Condiciones de PCR Tiempo Real para VHC y GAPDH

Temperatura	Tiempo	
50 °C	2 minutos	
95° C	10 minutos	
95 °C	15 segundos	} 40 ciclos
60 °C	60 segundos	

5.8. Análisis Estadístico

Para los resultados de viabilidad celular se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). En los resultados obtenidos por PCR tiempo real se utilizó un modelo de análisis factorial. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con ayuda del programa SPSS versión 15. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

6.- RESULTADOS

6.1 Ensayos de Viabilidad Celular en la línea de hepatocitos Huh-7-VHC expuestas a diferentes concentraciones del agente de transfección SIPORT Lipid a los 6 días de la transfección

Para determinar si el agente de transfección SIPORT Lipid era tóxico para las células Huh-7-VHC (establemente infectada con el subgenómico del VHC) se realizaron ensayos de viabilidad celular. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos con 2000 células por pozo y se determinó viabilidad por MTT. Las concentraciones utilizadas fueron las recomendadas por la casa comercial AMBION. Mediante estos ensayos se observó que las células expuestas el agente de transfección SIPORT Lipid presentaron una viabilidad sin diferencias significativas ($p=0.160$) del 105.1%, 114.5%, 102.8%, 110.78% al ser expuestas a un volumen de 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μ l respectivamente. En base a estos resultados se determinó que el agente de transfección no es tóxico para las células Huh-7-VHC a los 6 días de exposición (figura 10).

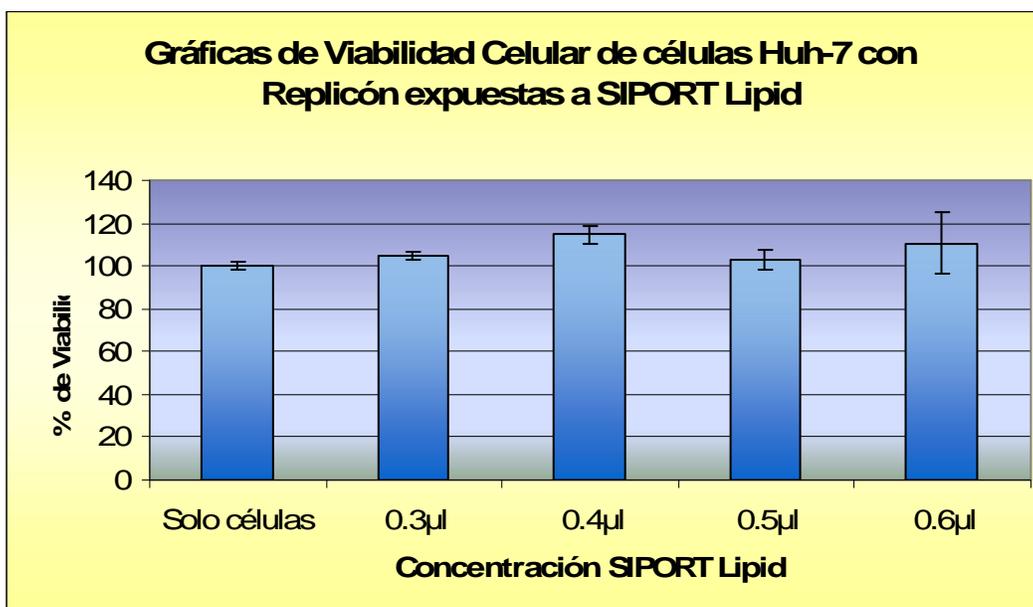


Figura 10. Gráficas de viabilidad celular en células Huh-7-VHC expuestas a diferentes cantidades del agente de transfección SIPORT Lipid y analizadas a los 6 días posteriores a la exposición. La columna de la izquierda muestra la absorbancia de células Huh-7-VHC sin transfectar y tomada como 100% de viabilidad celular, seguida de las células tratadas con diferentes cantidades del agente de transfección SIPORT Lipid (0.3, 0.4, 0.5, 0.6 µl). En las gráficas se muestra la desviación estándar de tres experimentos por separado, en la cual no se observan diferencias significativas entre las diferentes cantidades del agente de transfección SIPORT Lipid.

6.2 Ensayo de viabilidad celular por MTT de células transfectadas con 200 nM utilizando un siRNA y diferentes cantidades del agente de transfección SIPORT Lipid.

Al encontrar que el agente de transfección SIPORT Lipid no es tóxico para las células a los 6 días de exposición, y con el antecedente de ensayos previos sobre los resultados de citotoxicidad a los 2 días de exposición, se realizaron ensayos de viabilidad celular en células Huh-7-VHC transfectadas con un siRNA a fin de determinar si la concentración utilizada durante la transfección era tóxica para las células hasta los 6 días. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos con 2000 células por pozo y determinados por MTT.

Los resultados muestran que las células transfectadas con el siRNA junto al agente de transfección no presentaron diferencias significativas ($p=0.354$) resultando una viabilidad del 95.3%, 97.1%, 111% y 106.4% al ser transfectadas con 200nM del siRNA y 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 μ l del agente de transfección SIPORT Lipid (figura 11). En base a estos resultados se determinó que la transfección con el siRNA de interferencia y analizadas a los 6 días post-transfección no fue tóxica para las células.

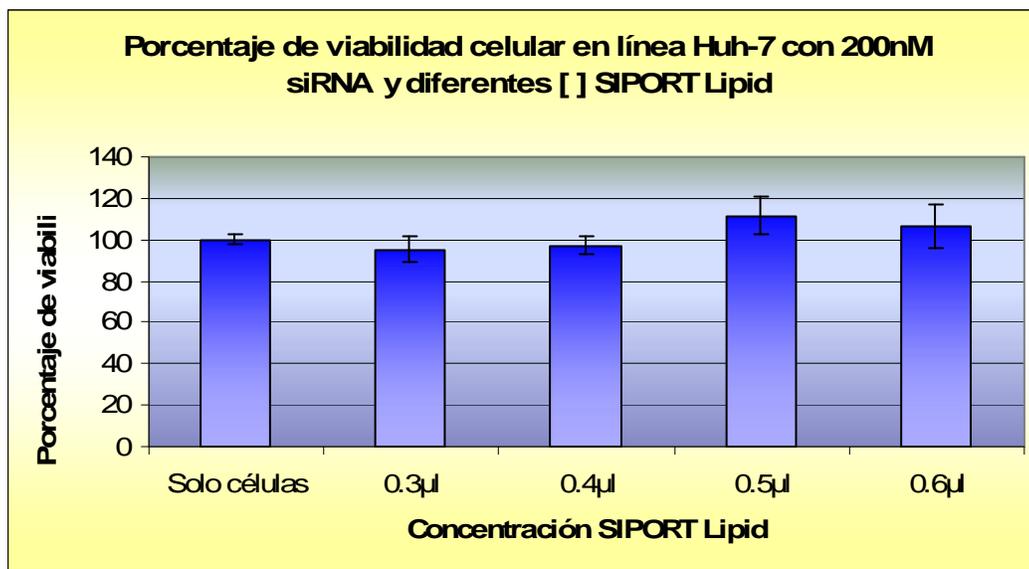


Figura 11. Gráfica de viabilidad celular en células Huh-7-VHC expuestas a 200 nM de siRNA. A la izquierda se muestran las células Huh-7-VHC sin transfectar y tomadas como control (100% de viabilidad), seguidas por las células transfectadas con 200 nM del siRNA y 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 µl del agente de transfección SIPORT Lipid respectivamente. En las gráficas se muestra la desviación estándar de tres experimentos por separado, en el cual no se observan diferencias significativas entre las células tratadas con las diferentes cantidades del agente de transfección SIPORT Lipid.

6.3. Inhibición de la replicación y expresión del subgenómico del VHC utilizando el RNA de interferencia “A” dirigido contra la región del gen NS5b.

6.3.1. Inhibición de la replicación del RNA subgenómico del VHC

Se transfectó la línea celular Huh7-VHC con el siRNA “A” a una concentración de 100 y 200nM y se analizó el RNA a los 2, 4 y 6 días post-transfección mediante RT-PCR Tiempo Real. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 24 pozos con 30000 células por pozo. Se realizó una RT y el cDNA fue cuantificado, posteriormente se utilizaron 200 ng para las amplificaciones en PCR Tiempo Real tanto para VHC como para GAPDH. Posteriormente se calcularon los niveles de RNA de VHC al normalizar los datos con las amplificaciones realizadas para GAPDH.

Los resultados obtenidos mostraron una inhibición significativa en los niveles de RNA de las células Huh-7-VHC transfectadas tanto con 100nM como con 200nM del RNA de interferencia a los 2, 4 y 6 días ($p < 0.001$). Se obtuvieron valores relativos de RNA viral de 0.514 y 0.467 con 100 y 200nM respectivamente a los 2 días, de 0.454 y 0.429 con 100 y 200nM respectivamente a los 4 días, 0.11 y 0.144 con 100 y 200nM respectivamente a los 6 días post-transfección (figura 12).

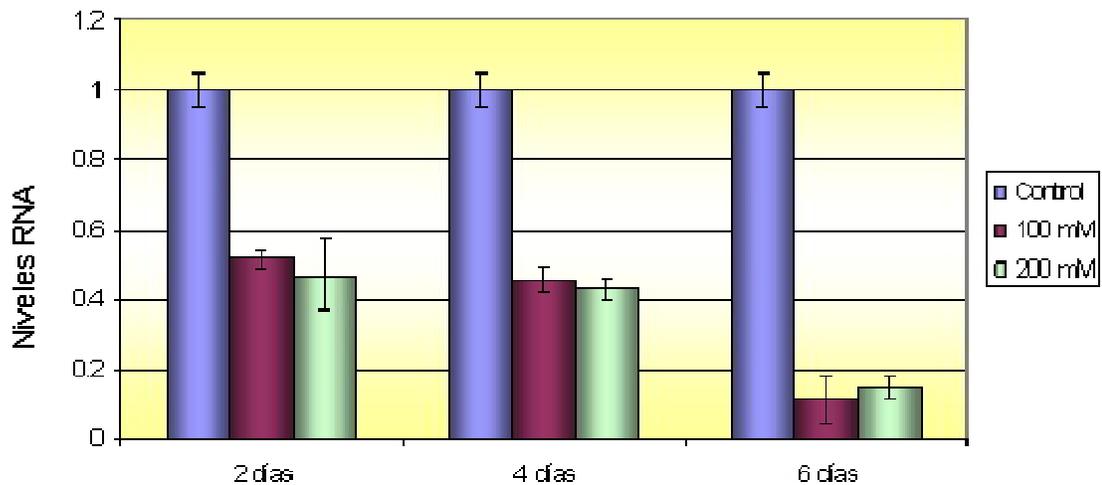


Figura 12. Resultados del RT-PCR Tiempo Real en células transfectadas con 100nM y 200nM del siRNA “A” y analizadas a los 2, 4 y 6 días post-transfección. Se analizaron los niveles de RNA viral en las células transfectadas con el siRNA “A” a los 2, 4 y 6 días post-transfección mediante PCR Tiempo Real. Se utilizó GAPDH para normalizar los datos. Las barras en azul muestran a las células sin tratamiento y tomadas como 1; las barras moradas y verdes representan a las células transfectadas con 100 y 200nM respectivamente. En las gráficas se muestra la desviación estándar de tres experimentos por separado, en el cual se observa una inhibición viral significativa a los tres tiempos con ambas concentraciones ($p < 0.001$).

6.3.2. Inhibición de la expresión de la proteína NS5b.

Se transfectó la línea celular con el siRNA “A” con 100 y 200 nM y se analizaron las proteínas virales por medio de Western blot a los 2, 4 y 6 días. A los 2 días post-transfección se observa una inhibición viral relativa de 0.55 y 0.4 con 100 y 200nM respectivamente, mientras que a los 4 días post-transfección no se observa inhibición aparente. En cuanto a los 6 días post-transfección se obtuvo una inhibición notable de la proteína NS5b, al detectar valores relativos de 0.08 y 0.07 con 100 y 200 nM respectivamente. Estos valores están expresados como valores relativos con respecto al control de células sin transfectar y a las cuales se les asignó el valor de 1 (figura 13).

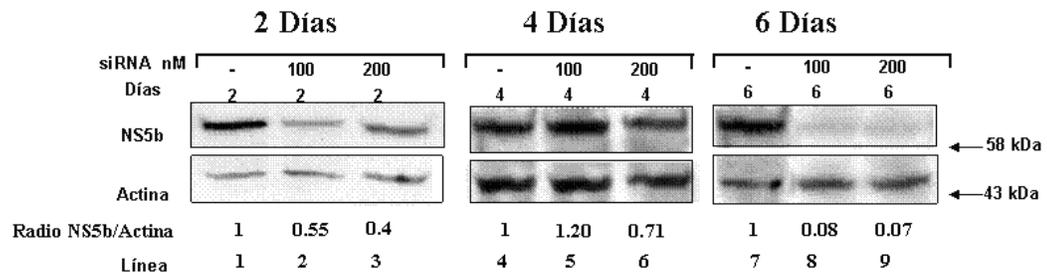


Figura 13. Efecto del siRNA “A” dirigido contra NS5b en la expresión del VHC en células Huh-7-VHC. Western blot realizado a partir de proteínas de la línea celular Huh-7-VHC sin transfectar y células transfectadas con 100 y 200 nM del siRNA “A” a los 2, 4 y 6 días post-transfección y utilizando anticuerpos específicos contra NS5b y Actina como se describe en la metodología.

6.4. Inhibición de la replicación y expresión del subgenómico del VHC utilizando el RNA de interferencia “B” dirigido contra la región del gen NS5b.

6.4.1. Inhibición de la replicación del RNA subgenómico del VHC

Se transfectó la línea celular Huh7-VHC con el siRNA “B” con 100 y 200nM y se analizó el RNA a los 2, 4 y 6 días post-transfección. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 24 pozos con 30000 células por pozo. Se realizó una RT y el cDNA fue cuantificado, posteriormente se utilizaron 200ng para cuantificar mediante PCR Tiempo Real el RNA-VHC como para RNA-GAPDH. Posteriormente se calcularon los niveles de RNA de VHC al normalizar los datos con las amplificaciones realizadas para la expresión de GAPDH.

Los resultados obtenidos a nivel de RNA de las células transfectadas con el siRNA “B” y analizadas a los dos días pos-transfección no muestran una inhibición significativa con respecto al control de células sin transfectar. Los niveles relativos de RNA viral encontrados a los 2 días fueron de 0.79 y 0.76 con 100 y 200 nM respectivamente. En el análisis de los 4 y 6 días, se observa un incremento significativo en el RNA viral, tanto para 100 como para 200nM del siRNA ($p=0.01$). Los valores relativos de RNA viral fueron de 1.29 y 1.27 a los 4 días con 100 y 200 nM respectivamente y de 1.51 y 1.27 en células transfectadas con 100 y 200 nM respectivamente a los 6 días post-transfección (figura 14).

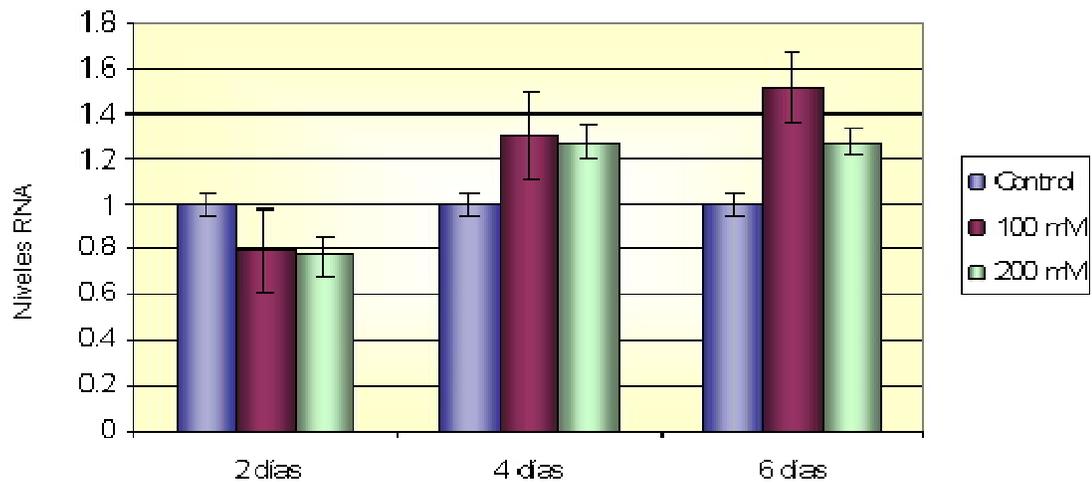


Figura 14. Resultados del RT-PCR Tiempo Real en células transfectadas con 100nM y 200nM del siRNA “B” y analizadas a los 2, 4 y 6 días post-transfección. Se analizaron los niveles de RNA viral en las células transfectadas con el siRNA “B” a los 2, 4 y 6 días post-transfección mediante PCR Tiempo Real. Se utilizó GAPDH para normalizar los datos. Las barras en azul muestran a las células sin tratamiento y tomadas como 1; las barras moradas y verdes representan a las células transfectadas con 100 y 200nM respectivamente. En las gráficas se muestra la desviación estándar de tres experimentos por separado. A los dos días no se observó un cambio significativo, mientras que a los 4 y 6 días posttransfección se observa un incremento significativo para ambas concentraciones ($p=0.01$)

6.4.2 Inhibición de la expresión de la proteína NS5b.

Se transfectó la línea celular con el siRNA “B” con 100 y 200 nM y se analizaron las proteínas virales por medio de Western blot a los 2, 4 y 6 días. A los 2 días post-transfección se observa un aumento de la proteína NS5b tanto con 100 como con 200nM del siRNA “B”, al detectar valores relativos de 3.81 y 3.72 respectivamente. A los 4 días post-transfección se observa un decremento en la expresión de la proteína NS5b, con valores relativos de 0.43 y 0.36 al ser transfectadas con 100 y 20nM respectivamente, mientras que a los 6 días post-transfección se obtuvieron valores relativos de proteína viral de 0.67 y 0.47 con 100 y 200 nM respectivamente. Estos

valores están expresados como valores relativos con respecto al control de células sin transfectar y a las cuales se les asignó el valor de 1(figura 15).

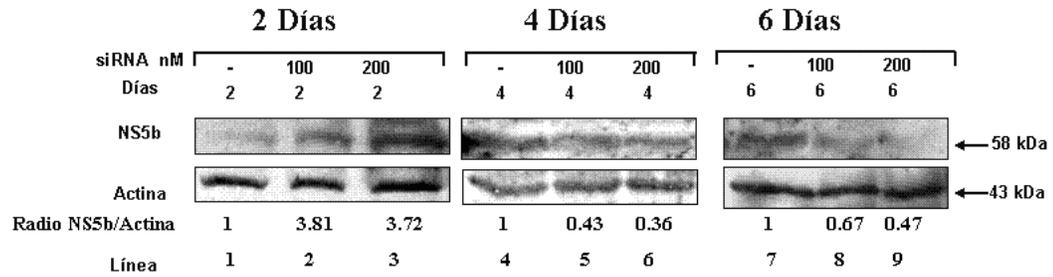


Figura 15. Efecto del siRNA “B” contra NS5b en la expresión del VHC en células Huh-7-VHC. Western blot realizado a partir de proteínas de la línea celular Huh-7-VHC sin transfectar y transfectadas con 100 y 200 nM del siRNA “B” a los 2, 4 y 6 días post-transfección y utilizando anticuerpos específicos contra NS5b y Actina como se describe en la metodología.

6.5. Inhibición de la replicación y expresión del subgenómico del VHC utilizando el RNA de interferencia “C” dirigido contra la región del gen NS5b.

6.5.1. Inhibición de la replicación del RNA subgenómico del VHC

Se transfectó la línea celular Huh7-VHC con el siRNA “C” con 100 y 200nM y se analizó el RNA a los 2, 4 y 6 días post-transfección. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 24 pozos con 30000 células por pozo. Se realizó una RT y el cDNA fue cuantificado, posteriormente se utilizaron 200ng para las amplificaciones en PCR Tiempo Real tanto para VHC como para GAPDH. Posteriormente se calcularon los niveles de RNA de VHC al normalizar los datos con las amplificaciones realizadas para GAPDH.

Los resultados obtenidos muestran una inhibición significativa a los 2 y 4 días, en ambas concentraciones ($p=0.001$). Los valores relativos de RNA viral detectados a los dos días fueron de 0.43 y 0.63 con 100 y 200 nM, y a los 4 días de 0.49 y 0.63 con 100 y 200 nM del siRNA. A los 6 días se observó un incremento en los niveles relativos de RNA viral de 1.59 y 1.43 (figura 16).

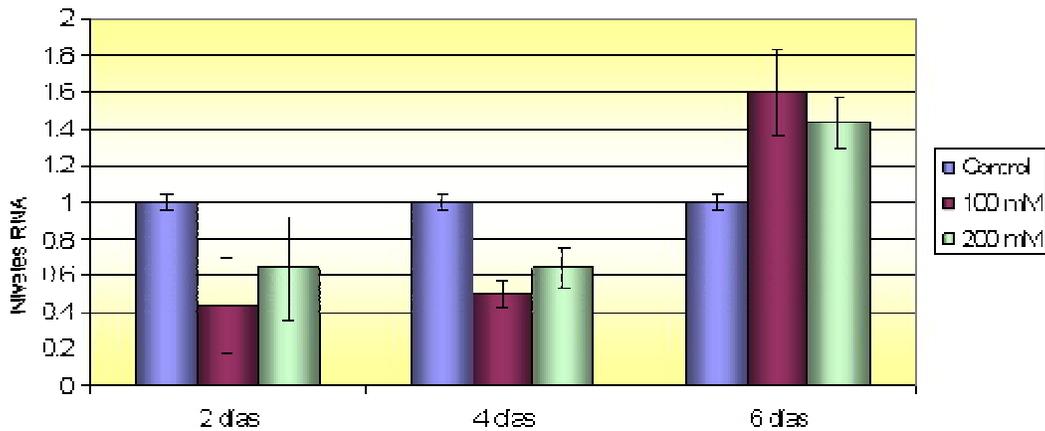


Figura 16. Resultados del RT-PCR Tiempo Real en células transfectadas con 100nM y 200nM del siRNA “C” y analizadas a los 2, 4 y 6 días post-transfección. Se analizaron los niveles de RNA viral en las células transfectadas con el siRNA “A” a los 2, 4 y 6 días post-transfección mediante PCR Tiempo Real. Se utilizó GAPDH para normalizar los datos. Las barras en azul muestran a las células sin tratamiento y tomadas como 1; las barras moradas y verdes representan a las células transfectadas con 100 y 200nM respectivamente. En las gráficas se muestra la desviación estándar de tres experimentos por separado. A los 2 y 4 días se observa una inhibición significativa para ambas concentraciones ($p=0.001$)

6.5.2. Inhibición de la expresión de la proteína NS5b

Se transfectó la línea celular con el siRNA “C” con 100 y 200 nM y se analizaron las proteínas virales por medio de Western blot a los 2, 4 y 6 días. Los resultados muestran una inhibición a los 2 días post-transfección, al obtener valores relativos de 0.50 y 0.48 con 100 y 200nM del siRNA C con respecto al control celular sin tratamiento. A los 4 y 6 días post-transfección no se observó inhibición aparente de la proteína viral en las condiciones analizadas (100 y 200nM) Estos valores están expresados como valores relativos con respecto al control de células sin transfectar y a las cuales se les asignó el valor de 1 (figura 17).

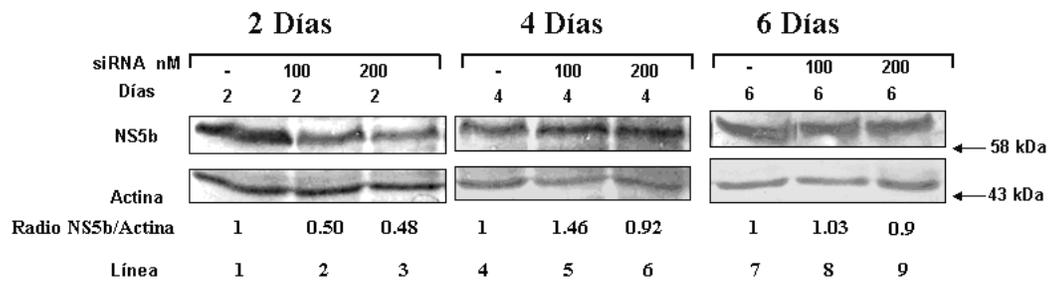


Figura 17. Efecto del siRNA “C” contra NS5b en la expresión del VHC en células Huh-7-VHC. Western blot realizado a partir de proteínas de la línea celular Huh-7-VHC sin transfectar y transfectadas con 100 y 200 nM del siRNA “C” a los 2, 4 y 6 días post-transfección y utilizando anticuerpos específicos contra NS5b y Actina como se describe en la metodología.

6.6. Inhibición del subgenómico del VHC utilizando el RNA de interferencia “A” en combinación con el siRNA “C”.

Con el fin de determinar el efecto combinado de 2 siRNAs de interferencia, se decidió evaluar el siRNA “A” (el cual tenía un mejor efecto inhibitorio) en combinación con el siRNA “C” (el cual presentó una mayor inhibición al ser analizado por RT-PCR Tiempo Real el cual es más sensible que la prueba de Western blot). Se utilizaron 100nM de cada siRNA, para tener una concentración final de 200nM de ambos siRNAs. La inhibición del subgenómico del VHC fue medida a nivel de RNA por medio de RT-PCR Tiempo Real y a nivel de proteínas mediante Western blot.

6.6.1. Inhibición de la replicación del RNA subgenómico del VHC utilizando las combinaciones del siRNA “A” y “C”.

Se transfectó la línea celular Huh7-VHC con 100nM del siRNA “A” y 100 nM del siRNA “C” y se analizó el RNA a los 2 y 4 días post-transfección. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas de 24 pozos con 30000 células por pozo. Se realizó una RT y el cDNA fue cuantificado, posteriormente se utilizaron 200ng para las amplificaciones en PCR Tiempo Real tanto para VHC como para GAPDH.

Los resultados obtenidos mostraron una inhibición significativa a los 2 días con niveles relativos de RNA viral de 0.56 ($p=0.001$) y en el caso de los 4 días, un aumento de 1.39 con respecto al control sin transfectar. Al observar que a los 4 días no se tenía inhibición del RNA viral, ya no se evaluó el efecto combinado de los siRNAs a los 6 días (figura 19).

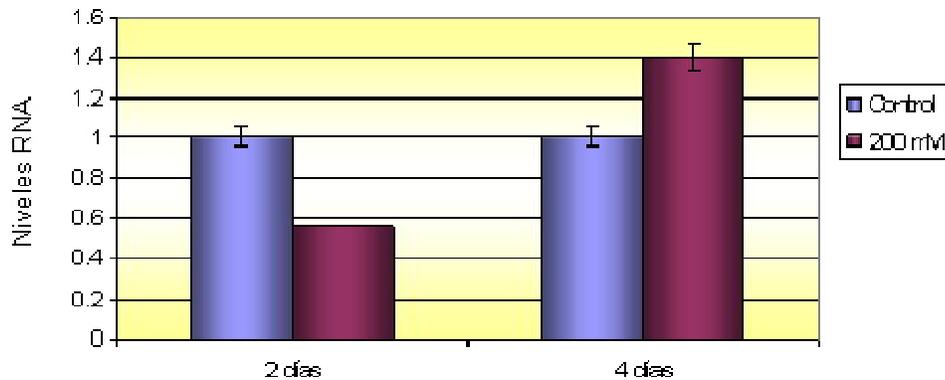


Figura 18. Resultados del RT-PCR Tiempo Real en células transfectadas con 100nM del siRNA “A” y 100 nM del siRNA “C” y analizadas a los 2 y 4 días post-transfección. Se analizaron los niveles de RNA viral en las células transfectadas con 100 nM del siRNA “A” más 100 nM del siRNA “C” a los 2 y 4 días post-transfección mediante PCR Tiempo Real. Se utilizó GAPDH para normalizar los datos. Las barras en azul muestran a las células sin tratamiento y tomadas como 1; las barras moradas y verdes representan a las células transfectadas con 100 y 200nM respectivamente. En las gráficas se muestra la desviación estándar de tres experimentos por separado. A los dos días post-transfección se observó una inhibición viral significativa con respecto al control de células sin transfectar ($p=0.001$).

6.6.2. Inhibición de la expresión de la proteína NS5b utilizando las combinaciones de los RNA’s de interferencia “A” y “C”.

Se transfectó la línea celular con 100nM del siRNA “A” y 100nM del siRNA “C” en forma combinada y se analizaron las proteínas virales por medio de Western blot a los 2, 4 y 6 días. Los resultados no mostraron una inhibición aparente de la proteína viral NS5b al transfectar la línea celular Huh7-VHC con 200nM cuando fueron analizadas a los 2, 4 y 6 días post-transfección (figura 18).

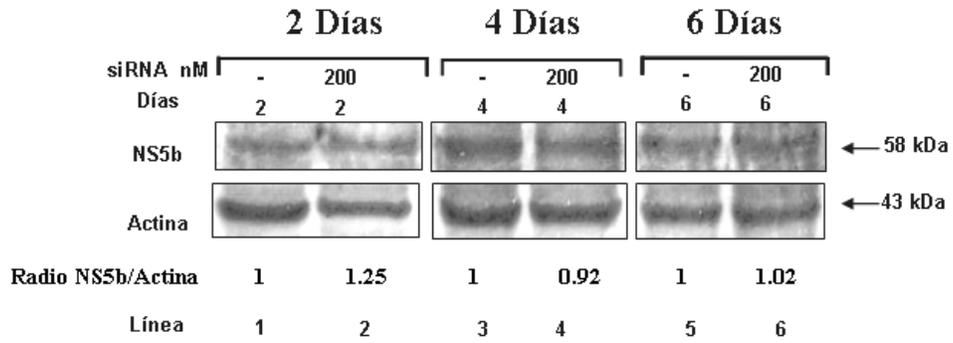


Figura 19. Efecto de la combinación del siRNA “A” y “C” dirigidos contra NS5b en la expresión del VHC en células Huh-7-VHC. Western blot realizado a partir de proteínas de la línea celular Huh-7-VHC sin transfectar y transfectadas con 100nM del siRNA “A” y 100nM del siRNA “C” y analizadas a los 2, 4 y 6 días post-transfección, utilizando anticuerpos específicos contra NS5b y Actina como se describe en la metodología.

7. DISCUSIÓN

Los siRNAs sintéticos han sido utilizados “*in vitro*” e “*in vivo*” para silenciar diferentes genes (Xia *et al.*, 2002). Debido al potencial de la tecnología del RNA de interferencia en degradar RNAm de manera específica, se ha despertado un gran interés en la comunidad científica en probar este sistema como tratamiento en enfermedades virales, desordenes genéticos y para combatir el cáncer.

La infección con el virus de la hepatitis C (VHC) representa una de las principales causas de enfermedades crónicas en hígado; sin embargo, la única terapia disponible es la administración de Interferón pegilado en combinación con la ribavirina, no obstante solo resulta efectiva en alrededor del 60% de los pacientes además de causar serios efectos colaterales.

Debido a que el genoma del VHC consta de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva, la cual funciona como RNAm y templado para la replicación del RNA viral por medio de un intermediario de cadena negativa, se sugiere que el VHC podría ser un blanco particularmente atractivo para la terapia con RNAi.

Existen diversos estudios (Yokota *et al.*, 2003; Kapadia *et al.*, 2003; Randall *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Prabhu *et al.*, 2005; Korf *et al.*, 2005) en donde se han evaluado diversos RNAi dirigidos contra diferentes regiones del VHC (UTR, Core, E2, NS3, NS5b), en los cuales se ha logrado inhibir eficientemente la replicación y expresión viral.

No obstante, los virus pueden cambiar su secuencia genómica y presentar resistencia a los diferentes tratamientos antivirales (Gitlin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). En el caso particular del VHC, el mecanismo de replicación viral presenta un alto índice de mutaciones, por lo que es posible que el RNA de interferencia no sea capaz de bloquear estas mutantes resistentes generadas en los tratamientos prolongados con el mismo RNAi. Esta resistencia ya ha sido demostrado en algunos trabajos, como el realizado por Konishi *et al* (Konishi *et al.*, 2006) en donde detecta resistencia por parte del VHC al RNAi al transfectar de manera continua un siRNA, demostrando que dicha resistencia fue debida a mutaciones en la región blanco del siRNA. Así mismo, Wilson y Richardson observaron que el bloqueo del VHC por un siRNA no se lleva a cabo de manera completa y que después de tratamientos repetidos con el mismo siRNA se obtienen replicones resistentes. Sin embargo, estos replicones no son resistentes a siRNAs dirigidos contra otra región del genoma, debido a que dicha resistencia se obtiene a través de mutaciones puntuales. Por lo tanto el uso de diversos RNA's de interferencia dirigidos contra diferentes blancos podría ser una alternativa que limitara el escape viral (Wilson y Richardson, 2005).

Es por ello que en este trabajo decidimos evaluar tres diferentes RNA's de interferencia dirigidos contra diferentes regiones del gen NS5b del VHC y determinar la posible ventaja en utilizar estos siRNAs de manera conjunta a fin de evitar el escape viral.

En este estudio, se analizó la inhibición del VHC en células Huh7-VHC transfectados con los RNA's de interferencia mediante RT-PCR Tiempo Real y Western blot. En cuanto al análisis por RT-PCR Tiempo Real, la mejor inhibición se obtuvo con el siRNA "A", en la cual se observa una inhibición del 89 y 86% a los 6 días post-transfección con 100 y 200 nM (figura 12). Esta inhibición también fue observada a nivel traduccional a los 6 días post-transfección, con una reducción del 91 y 95.3% utilizando las concentraciones de 100 y 200 nM respectivamente (figura 13).

En este sentido, se han realizado estudios de inhibición del VHC con RNA's de interferencia, entre los cuales se encuentra el realizado por Alejandro Martínez *et al* (Martínez *et al.*, 2003), en donde analizan diferentes siRNAs, obteniendo con uno de ellos una inhibición máxima del 88% en la replicación viral al utilizar 133nM de un siRNA dirigido contra la región NS3 del VHC y analizado por PCR Tiempo Real. En otro trabajo, realizado por Wilson *et al* (Wilson *et al.*, 2003), obtuvieron una inhibición del RNA viral >90% con siRNAs dirigidos contra la región NS5B medida por Northern blot. Takigawa *et al* (Takigawa *et al.*, 2004) por otra parte, transfectaron diferentes concentraciones de un siRNA dirigido contra la región NS3 del VHC, en donde obtuvieron inhibiciones de las proteínas virales de 30.1 y 46.4% con 200 y 1000nM. En base a estos trabajos se sugiere que el siRNA "A" demostró ser altamente eficiente al inhibir un 89% del RNA viral y 91 % de las proteínas virales al utilizar una concentración de 100 nM.

En cuanto a los ensayos con el siRNA "B" a los 4 y 6 días postransfección, y para el siRNA "C" a los 6 días post-transfección y analizados por RT-PCR Tiempo Real, encontramos una mayor cantidad de RNA viral con respecto al control de células sin transfectar, lo cual resultó contrario a lo esperado y reportado en múltiples trabajos en donde obtienen una inhibición eficiente del VHC por acción de diferentes siRNAs. En nuestros resultados además de no observar un efecto inhibitorio, observamos que los niveles de RNA viral se incrementan. Este aumento podría ser explicado por un efecto adverso o no esperado por parte del siRNA como fue reportado por Stephan P. Persengiev (Persengiev *et al.*, 2004), en donde evalúan el efecto de un siRNA control negativo y analizan los cambios en la expresión génica de las células transfectadas mediante microarreglos. En este estudio detectaron que más de mil genes involucrados en diversas funciones celulares son estimulados o reprimidos de manera no específica. El VHC utiliza tanto proteínas virales como proteínas celulares durante su replicación y podría ser que cambios como los reportados por Persengiev *et al* favorecieran la replicación viral.

Existen diversos trabajos en donde evalúan las posibles razones y soluciones para el efecto inespecífico del siRNA. Uno de ellos es el reportado por Lin *et al* (Lin *et al.*, 2005) en donde observan que una complementariedad de 7 nts entre el siRNA y los mRNA podría resultar en la degradación de estos últimos, dando una posible explicación para los efectos no específicos detectados en algunos trabajos. Por otra parte, este mismo grupo detectó que la presencia de la secuencia AGGCAGT en el extremo 3' de la región no traducible de genes no blanco fueron reprimidos por los RNAi, dando como resultado efectos inespecíficos (Lin *et al.*, 2005).

Además; Federov *et al* encontraron una relación entre la secuencia UGGC en la cadena en contacto con RISC, y la toxicidad causada por el siRNA (Federov *et al.*, 2006). Por otra parte, reportan que el 34% de los siRNAs tóxicos analizados en su trabajo contenían uno de los 6 pentámeros ricos en A-U: AUUUG; GUUUU, AUUUU; CUUUU; UUUUU; GUUUG (Federov *et al.*, 2006). En cuanto a las secuencias de los siRNAs utilizados en este trabajo, el siRNA “B” contiene la secuencia AUUUG, mientras que el siRNA “C” contiene la secuencia GUUUG, por lo que ambos siRNAs contienen uno de los pentámeros mencionados por Federov. Además, el siRNA “B” es el que presenta un mayor porcentaje de AU, con un 52.6%, seguido por el siRNA “C”, el cual contiene 47.3% de AU y por último el siRNA “A” presenta un 42% de AU. Esto es de suma importancia, ya que además de tener una secuencia relacionada con efectos inespecíficos, contienen un mayor porcentaje de AU, el cual está relacionado con este mismo efecto. Todo lo anterior podría explicar que el aumento en los niveles de RNA virales que encontramos podría deberse a un efecto inespecíficos por estos siRNAs.

Sin embargo, este aumento en los niveles de RNA viral no se ve reflejado a nivel traduccional, encontrando que no existen diferencias significativas con respecto al control. Una posible explicación sería que los siRNAs estén afectando la maquinaria traduccional. Para comprobar esto, se podrían analizar estos mismos RNAi en un sistema que contenga la región IRES, seguida de una secuencia de RNA diferente a la

del VHC y medir los niveles de proteínas codificados por el RNA. Con esto veríamos el efecto ejercido por los siRNAs en la traducción mediada por IRES.

En algunos trabajos como el realizado por Federov *et al* (Federov *et al.*, 2006), mencionan la necesidad de crear nuevos algoritmos que delimiten el apagado inespecífico de los RNAs de interferencia; además, proponen el uso de modificaciones químicas en éstos con el fin de reducir el riesgo de in especificidades.

Debido a la gran variabilidad en secuencias del RNA entre las quasiespecies y genotipos del VHC, adicionado al alto grado de mutación que presenta este virus, se evaluó la combinación de 2 siRNAs. Se midió la expresión de la proteína viral NS5b en las células Huh-7VHC transfectadas con las combinaciones de los siRNAs “A”+”C” mediante Western blot, sin embargo no se observó un efecto inhibitorio en ninguno de los tiempos analizados. Esto se corroboró mediante los resultados obtenidos por RT-PCR Tiempo Real de la combinación “A”+”C” en donde solo se obtuvo una disminución del 56% a los 2 días post-transfección, la cual es similar a la obtenida por el siRNA “A” de manera individual. Sin embargo a los 4 días se obtuvo un aumento en los niveles RNA viral. Estos resultados difieren a los obtenidos en otros trabajos, uno de los cuales fue realizado por Chen *et al*, en donde evalúan el efecto de 3 siRNAs dirigidos contra la región 5’UTR, y observan una mayor inhibición cuando combinan los RNA’s de interferencia (Chen *et al.*, 2007). No obstante, nosotros no encontramos un mejor efecto al combinar los siRNAs, lo cual era lo esperado al detectar un aumento en los niveles de RNA viral cuando fueron administrados de forma individual.

Con todo lo anterior podemos concluir que el RNAi es una poderosa herramienta que podría ser utilizada como terapia génica; sin embargo, se requieren de numerosos estudios que expliquen el mecanismo que origina una respuesta inespecífica por parte de los siRNAs, y con esto poder diseñar RNAs de interferencia altamente eficientes y sin efectos negativos o inespecíficos.

8. CONCLUSIONES

Se realizaron pruebas de citotoxicidad del agente de transfección SIPORT Lipid y del siRNA en la línea celular Huh-7-VHC a los 6 días post-transfección, observando que en ninguna de las concentraciones utilizadas causó citotoxicidad celular.

Obtuvimos una excelente inhibición de la replicación y expresión del subgenómico de VHC con el siRNA “A”, observamos una inhibición del 89 y 86% del RNA viral por PCR tiempo real y del 91 y 95.3% de la expresión de proteínas virales por Western blot con 100 y 200 nM respectivamente a los 6 días post-transfección.

La inhibición del subgenómico de VHC con los RNA de interferencia “B” y “C” fue baja a los 2 días post-transfección y contrario a lo esperado se obtuvo un aumento en los niveles de RNA viral a los 4 y/o 6 días post-transfección.

En la transfección con los RNA de interferencia combinados “A” y “C”, contrario a lo esperado, encontramos una inhibición muy pobre en los niveles de RNA viral a los dos días post-transfección y un aumento a los 4 días post-transfección, mientras que no se detectó inhibición de proteínas virales en los tiempos evaluados.

Nuestros resultados sugieren que la introducción de RNAs de interferencia dirigidos contra la región del gen NS5b inhiben eficientemente al VHC, sin embargo el uso combinado de dos o mas siRNAs podría desencadenar efectos negativos o bloquear la inhibición viral de los siRNAs individuales; por lo que es necesario estudiar los mecanismos moleculares asociados a este bloqueo en la inhibición, así

como su interacción con otros fármacos antes de ser utilizados como agentes terapéuticos.

LITERATURA CITADA

Addams N, Chamberlain R, Taylor L, Davidson F, Lin C, Elliott R, Simmonds P. 1997. Complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 6a. *Biochem Biophys Res Commun* 234(2):393-6.

Aguilar-Ramírez JR, Aguirre-García J, Bautista-González H, Baptista-González H, Bosques-Padilla FJ, Campollo-Rivas O, Contreras AM. 2002. Consenso Nacional sobre Hepatitis C. *Rev Invest Clin* 54:559-568.

Akhtar S, Benter I. 2007. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest* 117:3623-3632.

Akhtar S, Benter I. 2007. Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv Drug Deliv Rev* 59:164–182.

Bartenschlager R, Lohmann V. 2000. Replication of Hepatitis C Virus. *J Gen Virol* 81:1631-1648.

Bartenschlager R, Lohmann V. 2001. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 52: 1-17.

Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. 2004. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63:71–180.

Braasch DA. 2004. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1139–1143.

Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. 2005. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin Liver Dis* 25:105-117.

Brett DL, Charles MR. 2005. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436:933-938.

Bumcrot D, Manoharan M, Kotliansky V, Sah DW. 2006. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2:711-719.

Chen Z, Zhang L, Liu X. 2007. Effect of short interfering RNAs on hepatitis C Virus 5' untranslated region expression. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 4:319-21

Choo QL, Kuo GF, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.

De Francesco R, Tomei L, Altamura S, Summa V, Migliaccio G. 2003. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res* 58:1-16.

Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, Rice CM, Dubuisson J. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J Virol* 71:697-704.

Drazan KE. 2000. Molecular Biology of Hepatitis C Infection. *Liver Transpl* 6:396-406.

Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. 2002. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* 12:517-523.

Elbashir S, Lendeckel W, Tuschl T. 2006. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.

El-Serag HB, Mason A. 1999. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 34:745–50.

Fedorov Y, King A, Anderson E, Karpilow J, Ilsley D, Marshall W, Khvorova A. 2005. Different delivery methods different expression profiles. *Nat Methods* 2(4):241.

Federov Y, Anderson M, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall W, Khvorona A. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 12:1188–1196.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. 1973. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028.

Feld J, Hoofnagle J. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436:967-972.

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-810.

Francois C, Duverlie G, Reboulliat D, Khorsi H, Castelain S, Blum HE, Gatignol A, Wychowski C, Moradpour D, Meurs EF. 2000. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR mediated control of protein synthesis. *J Virol* 74:5587-5596.

Fretz C, Jeannel D, Stuyver L, Herve V, Lunel F, Boudifa A. 1995. HCV infection in a rural population of the Central African Republic. (CAR): evidence for three additional subtypes of genotype 4. *J Med Virol* 47:435-437.

Friebe P, Bartenschlager R. 2002. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76:5326-5338.

Gale MJ, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. 1997. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is

mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 230(2):217-227.

Gitlin L, Andino R. 2003. Nucleic Acid-Based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *J Virol* 77:7159-7165.

Gitlin L, Karelsky S, Andino R. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418:430-434.

Goffard A, Dubuisson J. 2003. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* 85:295-301.

Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535:34-38.

Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ. 2004. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 85:451-461.

He LF, Alling DF, Popkin TF, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH. 1987. Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration. *J Infect Dis* 156:636-640.

Hernández-García JL. 2005. ARN de interferencia y su importancia en la biomedicina molecular. *Bioquímica* 30:118-127.

Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, Adams D. 2001. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis* 14:279-87.

Hoofnagle J. 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 35:S21-S29.

Hoofnagle J, Seef L. 2006. Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *N Engl J Med* 355:2444-2451.

Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA. 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 176:1-20.

Hollins AJ, Omid Y, Benter IF, Akhtar S. 2007. Toxicogenomics of drug delivery systems: Exploiting delivery system-induced changes in target gene expression to enhance siRNA activity. *J Drug Target* 15:83-88.

Hong Z, Cameron CE, Walker MP, Castro C, Yao N, Lau JY, Zhong W. 2001. A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* 285:6-11.

Ichim T, Li M, Quian H, Papov I, Rycerz K, Zheng X, White D, Zhong R, Ming W. 2004. RNA interference: A Potent Tool for Gen-Specific Therapeutics. *Am J Transplant* 4:1227-1236.

Jeannel D, Fretz C, Traore Y, Kohdjo N, Bigot A, Pe G. 1998. Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. *J Med Virol* 55:92-97.

Jong-Ho L, In Y, Heejoon M. 2006. Nonstructural Protein 5B of Hepatitis C Virus. *Mol Cell* 21:330-336.

Kanto T, Hayashi N. 2006. Immunopathogenesis of Hepatitis C Virus Infection: Multifaceted Strategies Subverting Innate and Adaptive Immunity. *Intern Med* 45:183-191.

Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. 2003. Interference of Hepatitis C Virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4):2014-2018.

Khan AU. 2006. Ribozyme: a clinical tool. *Clin Chim Acta* 367:20-27.

Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizaea K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH, et al. 1990. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology* 12:671-675.

Konishi M, Wu C, Taito M, Hayashi K, Watanabe S, Adachi Y, Wu G. 2006. siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations. *J Viral Hepat* 13:756–761.

Korf M, Jarczak D, Beger C, Manns M, Kruger M. 2005. Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors. *J Hepatol* 43(2):225-234.

Lauer MG, Walker BD. 2001. Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* 345(1):41-51.

Lesburg CA, Radfar RF, Weber PC. 2000. Recent advances in the analysis of HCV NS5B RNA dependent RNA polymerase. *Curr Opin Investig Drugs* 1:289-296.

Li H, Li W, Ding S. 2002. Introduction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296:1319-1321.

Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM. 1994. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 68:5063-5073.

Lin C, Wu JW, Hsiano K, Su MS. 1997. The hepatitis C virus NS4A: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *J Virol* 71:6465–6471.

Lin X, Ruan X, Anderson M, McDowel J, Kroeger P, Fesik S, Shen Y. 2005. siRNA-mediated off target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res* 33:4527-4535.

Liu M, Ding H, Zhao P, Qin Z, Gao J, Cao M, Wu W, Qi Z. 2006. RNA interference effectively inhibits mRNA accumulation and protein expression of hepatitis C virus core and E2 genes in human cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(9):2049-2055.

Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. 1999. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science* 285:110-113.

Machida K, Cheng K, Pavio N, Sung V, Lai M. 2005. Hepatitis C Virus E2-CD81 Interaction Induces Hypermutation of the Immunoglobulin Gene in B Cells. *J Virol* 79:8079–8089.

Marcellin P, Asselah T, Boyer N. 2002. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology*. 36(5):S47-S56.

Martínez A, Yang W, Chen X, Love C, Glasebrook A, Zhao G. 2003. Small Interfering RNA molecules as potential anti-human Hepatitis C virus agents: Identification and Characterization of two siRNA Molecules Highly conserved in the mayor genotypes of the virus. *Preclinica* 1:274-283.

McHutchison JG, Patel K. 2002. Future therapy of Hepatitis C. *Hepatology* 36:S245-S252.

Mellor J, Colmes E, Jarvis L, Yap L, Simmonds P. 1995. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implication for virus classification. *J Gen Virol* 76:2493-2507.

Méndez-Sánchez N, Aguilar-Ramírez JR, Reyes A, Dehesa M, Juárez A, Castañeda B, Sánchez-Ávila F, et al. 2004. Etiology of Liver Cirrhosis in Mexico. *Ann Hepatol* 3:30-33.

Mittal V. 2004. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* 5:336-367.

Mizushima H, Hijikata M, Asabe S, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K. 1994. Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *J Virol* 68:6215-6222.

Neumann A, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ, Perelson AS. 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282:103-107.

Op de Beeck A, Cocquerel L, Dubuisson J. 2001. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 82:2589–2595.

Pavio N, Lai M. 2003. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system?. *J Biosci* 28:287-304.

Pavlovic D, Neville DC, Argaud O, Blumberg B, Dwek RA, Fischer WB, Zitzmann N. 2003. The hepatitis C virus p7 protein forms an ion channel that is inhibited by long-alkyl-chain iminosugar derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6104-6108.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39:5-19.

Persengiev S, Zhu X, Green M. 2004. Nonspecific concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10:12-18.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner A, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. 1998. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282:938-941.

Poynard T, Yuen M, Ratzu V, Lai C. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095-2100.

Prabhu R, Vittal P, Yin Q, Flemington E, Garry R, Robichaux W, Dash S. 2005. Small Interfering RNA Effectively Inhibits Protein Expression and Negative Strand RNA Synthesis From a Full-Length Hepatitis C Virus Clone. *J Med Virol* 76:511-519.

Puig-Basagoiti F, Sáiz JC. 2001. Replicones subgenómicos del virus de la hepatitis C (VHC): nuevas expectativas para la profilaxis y el tratamiento de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol* 24:506-510.

Randall G, Grakoui A, Rice CM. 2003. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:235-240.

Rapicetta M, Argentini C, Dettori S, Spada E, Pellicer G, Gandia C. 1998. Molecular heterogeneity and new subtypes of HCV genotype 4. *Res Virol* 149:293-297.

Reed KE, Rice CM. 2000. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 242:55-84.

Richter SS. 2002. Laboratory assays for diagnosis and management of Hepatitis C Virus Infection. *J Clin Microbiol* 40(12):4407-4412.

Rivas-Estilla AM, Panduro A. 2003. Mecanismos moleculares del virus de la hepatitis C, potenciales blancos terapéuticos. *Rev Invest Clin* 55:51-64.

Rivas-Estilla AM, Sánchez LV, Matsui O, Campollo O, Armendáriz- Borunda J, Segura-Ortega JE, Panduro A. 1998. Identification of hepatitis C virus (HCV) genotypes in infected patients from the west of Mexico. *Hepato Res* 12:121-130.

Rivas-Estilla AM, Svitkin Y, López-Lastra M, Hatzoglou M, Sherker A, Koromilas AE. 2002. PKR dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol* 76:10637-10653.

Robbins L. 1968. *Tratado de Patología*. Interamericana S.A.: Mexico, pp. 855-856.

Rosenberg S. 2001. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 313:451-464.

Rubin E, Farber J. 1992. *Patología Fundamentos*. America Panamericana: Mexico, pp. 389-390.

Ruggieri A, Argentini C, Kouruma F, Chionne P, D'Ugo E, Spada E. 1996. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 2 variants in West Central Africa (Guinea Conakry). *J Gen Virol* 77:1073-2076.

Rychahou P, Jackson L, Farrow B, Evers B. 2006. RNA interference: Mechanisms of action and therapeutic consideration. *Surgery* 140:719-25.

Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. 2003. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains

functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11646-11651.

Santel A, Aleku M, Keil O, Endruschat J, Esche V, Fisch G, Dames S, Löffler K, Fechtner M, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. 2006. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther* 13:1222–1234.

Sato K, Okamoto H, Aihara S, Hoshi Y, Tanaka T, Mishiro S. 1993. Demonstration of sugar moiety on the surface of hepatitis C virions recovered from the circulation of infected humans. *Virology* 196:354-357.

Seo Y, Abrignani S, Houghton M, Han J. 2003. Small Interfering RNA-Mediated Inhibition of Hepatitis C Virus Replication in the Human Hepatoma Cell Line Huh-7. *J Virol* 77:810–812.

Shirota Y, Luo H, Qin W, Kaneko S, Yamashita T. 2002. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 277:11149–11155.

Shimakami T, Hijikata M, Luo H, Ma YY, Kaneko S. 2004. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 78:2738–2748.

Shlomai A, Shaul Y. 2004. RNA interference – small RNAs effectively fight viral hepatitis. *Liver Int* 24:526–531.

Soler M, McHutchison JG, Kwoh TJ, Dorr FA, Pawlotsky JM. 2004. Virological effects of ISIS 14803, an antisense oligonucleotide inhibitor of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES), on HCV IRES in chronic hepatitis C patients and examination of the potential role of primary and secondary HCV resistance in the outcome of treatment. *Antivir Ther* 6:953-68.

Takigawa Y, Nagano-Fuji M, Deng L, Hidajat R, Tanaka M, Mizuta H, Hotta H. 2004. Suppression of Hepatitis C Virus Replicon by RNA Interference Directed against the NS3 y NS5B Regions of the Viral Genome. *Microbiol Immunol* 48(8):591-598.

Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K. 1995. A novel sequences found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* 215:744-749.

Thierry P, Man-Fung Y, Vlad R, Ching LL. 2003. Viral hepatitis C. *Lancet* 362:2095-2100.

Trujillo-Murillo K, Garza-Rodriguez ML, Martinez-Rodriguez H, Barrera-Saldaña H, Bosques-Padilla F, Ramos-Jimenez J, Rivas-Estilla A. 2004. Experimental models for hepatitis C virus (HCV). New opportunities for combating hepatitis C virus (HCV): new opportunities for combating hepatitis C. *Ann Hepatol* 3(2):54-62

Uribe M, Méndez-Sánchez N. 2002. Hepatitis C in México. *Rev Gastroenterol Mex* 67: S7-S8

Valladares-Álvarez G. 2003. Factores de riesgo para la progresión de la infección crónica de la hepatitis viral C. *Rev Gastroenterol Perú* 23:126-133.

Van de Water FM, Boerman OC, Wouterse AC, Peters JG, Russel FG, Masereeuw R. 2006. Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. *Drug Metab Dispos* 34:1393–1397.

Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM, Baker BF. 2003. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem* 278:7108–7118.

Wang J, Tong W, Zhang X, Chen L, Yi Z, Pan T, Hu Y, Xiang L, Yuan Z. 2006. Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett* 580(18):4392-400.

Wang QM, Hockman MA, Staschke K, Johnson RB, Case KA, Lu J, Parsons S, Zhang F, Rathnachalm R, Kirkgaard K, Colacino JM. 2002. Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA dependent RNA polymerase. *J Virol* 76:3865-3872.

WHO. 1997. World Health Organization. Hepatitis C: Global Prevalence. *Wkly Epidemiol Rec* 72(10):65-72.

Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JS, Rusell PK, Trend DW. 1985. Flaviviridae. *Intervirology* 24:183-192.

Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. 2003. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100:2783–2788.

Wilson J, Richardson C. 2005. Hepatitis C Virus Replicons Escape RNA Interference Induced by a Short Interfering RNA Directed against the NS5b Coding Region. *J Virol* 79:7050–7058.

Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. 2002. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol.* 20:1006-1010.

Yanagi M, StClaire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. 1999. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2291-2295.

Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H. 2003. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO* 4:602–608.

Yupeng H, Seng-Lai T, Semih U, Sangeetha V, Jeffrey O, Bertrman L. 2001. Regulation of mRNA Translation and Cellular Signaling by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein. *J Virol* 75:5090–5098.

Zang M, Gaschen W, Blay B, Foley N, Haigwood C, Kuiken, Korber B. 2004. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology* 14:1229–124.

Zein NN. 2000. Clinical significance of hepatitis C genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13:223–235.

Zein NN. 2003. The epidemiology and natural history of Hepatitis C Virus infection. *Cleve Clin J Med* 70:(4):S2-S6.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Acrilamida/Bisacrilamida
 - 87.6 g de Acrilamida
 - 2.4 g de BisacrilamidaAforar a 300 ml con agua destilada.
- SDS 10% (w/v)
 - 10 g de SDSAforar a 100 ml con agua destilada.
- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
 - 27.23g de Tris baseAjustar a pH 8.8 con HCl y aforar a 150 ml con agua destilada
- Tris HCl 0.5 M pH 6.8
 - 6 gr Tris baseAjustar a pH6.8 con HCl y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Buffer de Desnaturalización
 - 1.25 ml Tris-HCl 0.5M pH 6.8
 - 2.5 ml Glicerol
 - 2 ml SDS 10 %
 - .2 ml Azul de Bromofenol
 - 3.55 ml Agua destiladaAñadir 50µl de b-mercaptoetanol a 950 de buffer de muestra. Diluir las muestras 1:1 Con el buffer y calentarlas a 95° C por 4 minutos .
- Buffer de Corrida 10X
 - 30.3gr Tris Base
 - 144 gr Glicina
 - 10gr SDSAforar a 1 litro con agua destilada
- Persulfato de amonio (PSA) 10%

- 100mg PSA
Aforar a 1 ml de agua destilada.
- Buffer de Transferencia 10X
 - 144 g Glicina
 - 30 g Tris Base
 Aforar a 1 litro con agua destilada
- Buffer de Transferencia 1X
 - 100 ml Stock 10 X
 - 200 ml de metanol
 - 700 ml de agua destilada
- TBS 10X
 - 31.5 gr de Tris HCl
 - 80gr NaCl
 Ajustar a pH 7.6 y aforar a 1 Litro con agua destilada
- Buffer de Bloqueo
 - 10 ml de TBS 1X
 - 0.5 gramos de leche
 - 0.5 ml de Tween 20
- Buffer de Lavados
 - 500 ml TBS 1X
 - 0.5 ml Tween 20
- Anticuerpo dilución 1:1000
 - 10 ml TBS 1 X
 - 0.5 gramos de leche
 - 10 µl del anticuerpo
- Buffer de lisis 5X
 - 5 ml Triton X-100 100%
 - 5 ml Tris-HCl 1 M pH 7.5
 - 12.5 ml KCl 2 M
 - 1 ml MgCl₂ 1 M
 Aforar a 100 ml con agua destilada
- Buffer de lisis 1X completo
 - 2 ml de buffer de lisis 5X
 - 10 µl de Ditiotritol (DTT)
 - 10 µL PMSF 0.5 M
 - 400 µl stock inhibidor de proteasas
 Aforar a 10 ml

- Preparación del Gel de acrilamida (10 ml)

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

*Gel Separador- Tris-HCl pH 8.8 1.5M

*Gel Concentrador- Tris-HCl pH 6.8 0.5M

RESUMEN BIOGRÁFICO

Regina Elizondo González

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN REPLICÓN SUBGENÓMICO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, CON RNA'S DE INTERFERENCIA.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey Nuevo León el 26 de Noviembre de 1983, hija de Reynaldo Elizondo Rodríguez y Regina González Martínez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2004.

Experiencia Profesional: Practicas profesionales realizadas en Quimiproducos (6 meses) en el 2005.

Puesto de Investigador Químico en el área de Investigación y Desarrollo en la empresa Quimiproducos por un periodo de 8 meses en el 2006.

Estancia en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (UANL) a cargo de la Dra. Ana María Rivas Estilla (2005-2008)

Premios: Premio a la Mejor Tesis de Licenciatura convocado por la Universidad Autónoma de Nuevo León en el año 2007

Artículos Publicados:1