

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



“EFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SOBRE LA
ACTIVIDAD PROTEASA-HELICASA DE LA PROTEÍNA
NS3/4A DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)”

PRESENTADO POR:

Q.F.B. HOMERO HERNÁNDEZ FLORES

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERIA GENÉTICA

AGOSTO, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



“EFECTO DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO SOBRE LA
ACTIVIDAD PROTEASA-HELICASA DE LA PROTEÍNA
NS3/4A DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)”

PRESENTADO POR:

Q.F.B. HOMERO HERNÁNDEZ FLORES

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

AGOSTO, 2012

Efecto del ácido acetilsalicílico sobre la proteasa-helicasa NS3/4A del VHC.

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Director de Tesis



Dr. C. Román Vidaltamayo Ramírez

Co-Director de Tesis



Dra. C. Ana María Gpe. Rivas Estilla

Co-Directora de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado.

RESUMEN

El virus de la hepatitis C fue identificado en 1989 como el principal agente causal asociado a la transfusión sanguínea de la hepatitis no A no B. Hoy este virus representa una crisis de salud mundial con una prevalencia de alrededor del 2.2% por lo que es urgente una terapia específica contra este virus. Una diana terapéutica probada con diferentes fármacos es la proteína de membrana NS3/4A, la cual posee actividad proteasa-helicasa.

El objetivo de esta tesis fue el demostrar que el ácido acetilsalicílico puede funcionar como un inhibidor de la actividad proteasa-helicasa de la proteína NS3/4A. Nuestra hipótesis fue fundamentada mediante diferentes hallazgos en la literatura en donde se observa que el ácido acetilsalicílico inhibe la actividad ATP-asa, la cual es inherente a la actividad de helicasa. Por otro lado, sugerimos una inhibición en la actividad proteasa debido a la interacción que existe entre la proteína NS3 y el ácido acetilsalicílico según unos estudios *in silico*, utilizando ambas moléculas.

Para lograr demostrar nuestra hipótesis se realizaron ensayos para la detección de las actividades proteasa y helicasa de la proteína NS3/4A que tuvieron como sustratos moléculas fluorescentes para aumentar la sensibilidad.

Nuestros datos muestran que no existe una inhibición por parte del ácido acetilsalicílico en ninguna de las dos actividades de la proteína NS3/4A, al menos al utilizar la proteína recombinante y el extracto de membranas.

Por otro lado, los experimentos hechos en células HUH7 replicón confirman los resultados obtenidos por otros investigadores. En donde se encuentra una inhibición estadísticamente significativa en las actividades helicasa y proteasa de la proteína NS3/4A debida probablemente al efecto sinérgico que provoca el ácido acetilsalicílico, al activar diferentes genes en la célula tratada.

DEDICATORIA

El presente trabajo se los dedico a mi esposa
Que espero por mi dos años, que tolero por
Amor mi ausencia.

A mi esposa, el último refugio de mi alma.
A mi hija, representante del eterno amor al prójimo.
A la vida, por esta gran lección.

*“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el
mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”*

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Viviana Zomosa Signoret, por su paciencia y apoyo, por aceptarme como su alumno, por guiarme, Usted es mi ejemplo de un ser humano dedicado a la investigación.

A la Dra. Ana María Rivas Estilla, por la oportunidad que me dio en el momento que más lo necesitaba. Por todos esos consejos que me dio y hasta hoy entiendo. Gracias.

Le agradezco a ambas el no abandonarme en mis momentos más oscuros. Sé que les debo muchísimo, espero estar algún día a su nivel profesional y humano.

Por ultimo, pero no por ello menos importante, al Dr. Román Vidal Tamayo, por aceptar ser mi asesor de tesis, sus experimentadas observaciones siempre me hicieron pensar que existen otras posibilidades.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco hacer mi estancia en el departamento de Bioquímica una etapa de mi vida enriquecedora: Alí, Azalea, Mario, Juan.



TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	vi
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Historia y epidemiología del Virus de la Hepatitis C.	1
I.2 Progreso de la enfermedad y Tratamiento.....	2
I.3 Sistemas experimentales para estudiar el Virus de la Hepatitis C	5
I.4 Ciclo de vida del Virus de la Hepatitis C.	5
I.5 La proteína NS3/4A.....	11
I.5.1 Evasión inmune por la proteína NS3/4A	14
I.5.2 Inhibidores de la actividad proteasa de la proteína NS3/4A	15
CAPITULO II. JUSTIFICACION	17
CAPITULO III. OBJETIVOS	18
III.1. OBJETIVO GENERAL	18
III.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
CAPITULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
IV.1. ÁREA FÍSICA.....	19
IV.2. ORIGEN DE LOS REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO	19
IV.2.1 REACTIVOS	19
IV.2.1.1 Reacciones enzimáticas.....	19
IV.2.1.2 Cultivo celular.....	21
IV.2.2 EQUIPOS.....	21
IV.3. MÉTODOS	22
CAPITULO V. RESULTADOS	30
CAPITULO VI. DISCUSION	43
CAPITULO VII. CONCLUSIONES	47
CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS	48
CAPITULO IX. REFERENCIAS.....	49

i



ANEXOS 62



LISTA DE FIGURAS

FIGURA1.1. PREVALENCIA DEL VHC A NIVEL MUNDIAL. FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA (). PORCENTAJES DE PREVALENCIA POR PAÍS INDICADA EN RECUADROS, LA INTENSIDAD DEL COLOR INDICA DONDE SE ENCUENTRA EL MAYOR NUMERO DE CASOS.	1
FIGURA1.2. ÁRBOL FILOGENÉTICO DEL VHC, DONDE SE MUESTRA LOS GENOTIPOS Y PRINCIPALES ÁREAS GEOGRÁFICAS DONDE PREVALENCEN FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA (14).	3
FIGURA1.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL VHC EN TERRITORIO MEXICANO DIVIDIDO EN 4 ZONAS GEOGRÁFICAS, LOS VALORES DADOS ESTÁN EN PORCENTAJE. FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA (16).	4
FIGURA1.4 ENTRADA DEL VHC EN LA CÉLULA. FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA (23).	6
FIGURA 1.5.- TRADUCCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA POLIPROTEÍNA. EL RNA VIRAL DEL VHC ES TRADUCIDO EN UNA GRAN POLIPROTEÍNA, CADA PROTEÍNA INDIVIDUAL ES PRODUCIDA POR CORTES DE PROTEASAS CELULARES. LOS SITIOS ESTÁN INDICADOS CON FLECHAS NEGRAS, Y POSTERIORMENTE, CORTADAS POR PROTEASAS VIRALES, EN AMARILLO UN SITIO DE CORTE ÚNICO POR LA PROTEÍNA NS2, Y TODOS LOS CORTES POSTERIORES SON REALIZADOS POR LA PROTEÍNA NS3. FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA 30.....	7
FIGURA1.6 TOPOLOGÍA DEL COMPLEJO DE REPLICACIÓN. FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA ().	8
FIGURA1.7 LAS DIFERENTES ETAPAS DEL CICLO DE VIDA DEL VHC. FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA .	10
FIGURA1.8 ESTRUCTURA CRISTALINA DEL DOMINIO PROTEASA DE LA PROTEÍNA NS3. LAS LÁMINAS BETA SE MUESTRAN EN COLOR NARANJA Y LAS ALFA-HÉLICES EN COLOR VERDE, LOS AMINOÁCIDOS CATALÍTICOS SE MUESTRAN COMO ESFERAS Y PALILLOS. FIGURA TOMADA DE REFERENCIA 70.	12
FIGURA1.9 SECUENCIA DE LA PROTEÍNA NS4A. EN ESTA FIGURA SE REPRESENTAN LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA PROTEÍNA NS4A Y ADEMÁS SE INDICAN LOS DIFERENTES DOMINIOS. FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA 70.....	13
FIGURA1.10 ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA PROTEÍNA NS3/4A. DE COLOR AMARILLO SE OBSERVA EL DOMINIO PROTEASA DE LA PROTEÍNA NS3 Y DE COLOR AZUL LA PROTEÍNA NS4A. FIGURA ADAPTADA DE REFERENCIA 79.....	14
FIGURA 4.1 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL PARA MEDIR LAS ACTIVIDADES DE LA PROTEÍNA NS3/4A....	22
FIGURA 4.2 DIAGRAMA DE FLUJO PARA REALIZAR EL EXPERIMENTO PARA CALCULAR LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.	23
FIGURA 4.3 DIAGRAMA DE FLUJO DEL OBJETIVO NÚMERO 1. EN ESTA FIGURA SE DESGLOSA EL PROCEDIMIENTO QUE SE SIGUIÓ PARA REALIZAR EL PRIMER OBJETIVO ESPECÍFICO.....	24
FIGURA 4.4 DIAGRAMA DE FLUJO QUE INDICA LOS PASOS QUE SE SIGUIERON PARA EL EXPERIMENTO DONDE SE COMPRUEBA SI EL SUSTRATO ES EL REACTIVO LIMITANTE PARA OBSERVAR EL EFECTO DEL AAS SOBRE LA PROTEÍNA NS3/4A.	25
FIGURA 4.5 DIAGRAMA DE FLUJO PARA OBTENCIÓN DE COMPLEJO NS3/4A-MEMBRANA DE CÉLULAS HUH7 REPLICÓN. LAS CÉLULAS DESPUÉS DE LLEGAR A LA CONFLUENCIA SON LISADAS A TRAVÉS DE UN HOMOGENEIZADOR DOUNCE Y A TRAVÉS DE CENTRIFUGACIÓN SON SEPARADAS DE SUS ORGANELOS.	26
FIGURA 4.6 DIAGRAMA DE FLUJO DEL OBJETIVO NÚMERO UNO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD HELICASA BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO.....	28
FIGURA 4.7 CONFIGURACIÓN DE PLACA DE 96 POZOS. ESTE ES UN EJEMPLO DE CÓMO SE CONFIGURO UNA PLACA DE PARA CADA EXPERIMENTO, SE DEBE DESTACAR QUE LOS POZOS DE LAS LÍNEAS	



MÁS EXTERNAS SE LLENARON CON AMORTIGUADOR PARA EVITAR UN PROBLEMA DE EVAPORACIÓN DE SOLVENTE.....	29
FIGURA 5.1 RESULTADO EN IMAGEN DE ANÁLISIS DE DOCKING ENTRE LA PROTEÍNA NS3/4A Y EL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO. REALIZADO EN EL MOLECULAR DOCKING SERVER. HTTP://WWW.MOLECULARSTATION.COM/	30
FIGURA 5.2 RESULTADO EN IMAGEN DE ANÁLISIS DE DOCKING ENTRE LA PROTEÍNA NS3Y EL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO. REALIZADO EN EL MOLECULAR DOCKING SERVER, HTTP://WWW.MOLECULARSTATION.COM/. LOS AMINOÁCIDOS DE POSIBLE INTERACCIÓN SON: ISOLEUCINA 35, VALINA 36, SERINA 37, TREONINA 38, GLICINA 41, ALANINA 45, CISTEÍNA 52, ARGININA 62, TREONINA 63, ALANINA 65, Y SERINA 66.....	31
FIGURA 5.3 GRAFICA CORRESPONDIENTE A LOS DATOS OBTENIDOS DE LA CINÉTICA PARA CALCULAR LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN A TRAVÉS DEL MÉTODO GRAFICO DE DOBLES RECÍPROCOS O DE LINEWEAVER-BURK.....	32
FIGURA 5.4 GRÁFICO DONDE SE MUESTRA UN COMPARATIVO ENTRE LA ACTIVIDAD PROTEASA DE LA PROTEÍNA NS3/4A BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y UN CONTROL SIN EL COMPUESTO.	33
FIGURA 5.5 GRÁFICO DONDE SE MUESTRA UN COMPARATIVO ENTRE LA ACTIVIDAD (RFU) PROTEASA DE LA PROTEÍNA NS3/4A EXPUESTA A ALTAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO. DEBE MENCIONARSE QUE DESPUÉS DE 4MM ESTE EFECTO PIERDE INTERÉS CLÍNICO, POR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DEL AAS.	34
FIGURA 5.6. GRAFICA DE ACTIVIDAD PROTEASA CON RESPECTO AL TIEMPO DE LA PROTEÍNA NS3/4A. COMO PUEDE OBSERVARSE EN LA GRÁFICA, EL COMPORTAMIENTO ES SIMILAR A CUALQUIER CONCENTRACIÓN DE AAS, Y NO EXISTE DIFERENCIA AL MENOS A LAS DOS HORAS DE REACCIÓN. EL CONTROL ES LA REACCIÓN ENZIMÁTICA SIN LA ADICIÓN DE AAS.....	35
FIGURA 5.7 ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA NS3/4A AL VARIAR LA CANTIDAD DE SUSTRATO Y MANTENER A 2MM EL AAS. A) REACCIÓN REALIZADA CON 3VECES LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN EN SUSTRATO. B) REACCIÓN REALIZADA CON 1 VEZ LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN EN SUSTRATO. C) REACCIÓN REALIZADA CON 3 VECES MÁS SUSTRATO QUE EL UTILIZADO EN UNA REACCIÓN HABITUAL.....	36
FIGURA 5.8 GRÁFICA DE PORCENTAJES DE ACTIVIDAD PROTEASA DE CÉLULAS HUH-7 TRATADAS CON AAS POR 24 HORAS. PARA ESTE EXPERIMENTO SÓLO SE UTILIZAN LAS MEMBRANAS DE LAS CÉLULAS.....	37
FIGURA 5.9 CURVA DE CALIBRACIÓN UTILIZANDO COMO ESTÁNDAR ALBÚMINA SÉRICA BOVINA. ESTA CURVA DE CALIBRACIÓN TIENE UNA R CUADRADA DE 0.9897 LO QUE INDICA QUE PREDICE EL COMPORTAMIENTO LINEAL DEL PROCEDIMIENTO.	38
FIGURA 5.10 GRAFICA DE TITULACIÓN DE SITIOS ACTIVOS. EN ESTA GRÁFICA SE OBSERVA LA POTENTE INHIBICIÓN DEL OLIGO DT, QUE A CONCENTRACIONES DE 750NM DISMINUYE HASTA EN UN 50% LA ACTIVIDAD DE LA HELICASA NS3/4A	39
FIGURA 5. 11 GRAFICA CORRESPONDIENTE AL CONTROL Y DOS CONCENTRACIONES SUCEASIVAS DE OLIGO DT, EN DONDE SE OBSERVA UN COMPORTAMIENTO LINEAL A BAJAS CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR. ESTOS PUNTOS CORRESPONDEN AL SEGMENTO A, DE LA CURVA ORIGINAL.	40
FIGURA 5.12 GRAFICAS DE ACTIVIDAD HELICASA BAJO TRES TRATAMIENTOS DIFERENTES DE AAS. LA GRAFICA DEL LADO IZQUIERDO INDICA EL DESCENSO DE LA SEÑAL CON RESPECTO AL TIEMPO. EN EL LADO DERECHO, LA GRAFICA INDICA EL AUMENTO DE ACTIVIDAD DE LA HELICASA CON RESPECTO AL TIEMPO, OBSERVÁNDOSE QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL CONTROL Y LAS DEMÁS CONCENTRACIONES DE AAS.....	41



FIGURA 5.13 GRAFICA DE ACTIVIDAD HELICASA DEL EXTRACTO DE MEMBRANAS DE CÉLULAS HUH7 REPLICÓN BAJO TRATAMIENTO CON ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, EN UN RANGO DE CONCENTRACIONES DE 0, 2, 4 Y 6MM, POR 24 HORAS..... 42



ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
μ L	microlitros
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
DNA	Acido Desoxirribonucleico
gr	gramos
h	horas
Km	constante de Michaelis-Menten
min	minutos
seg	segundos
ml	mililitros
mM	milimolar
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
RFU	unidades de fluorescencia relativa
RNA	acido ribonucleico
nm	nanómetros
nM	nanomolar
VPH	virus de la hepatitis C
Vmax	velocidad maxima

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

I.1 Historia y epidemiología del Virus de la Hepatitis C.

Con el desarrollo de pruebas diagnósticas específicas para el virus de la hepatitis A y el virus de la hepatitis B a mediados de los años 70, se demostró que algunos casos de hepatitis que surgían después de la transfusión sanguínea no eran causa de ninguno de estos agentes virales. Es por ello que se acuñó el término “hepatitis no A, no B”; a pesar de que existía evidencia de que este agente etiológico era un virus pequeño envuelto, no se había aislado¹. Fue hasta el año 1988, que se aisló una clona de cDNA sencillo, derivada de plasma de chimpancés infectados con “hepatitis no A, no B”. Esta clona mostró ser producto de un nuevo flavivirus, nombrado virus de la hepatitis C².

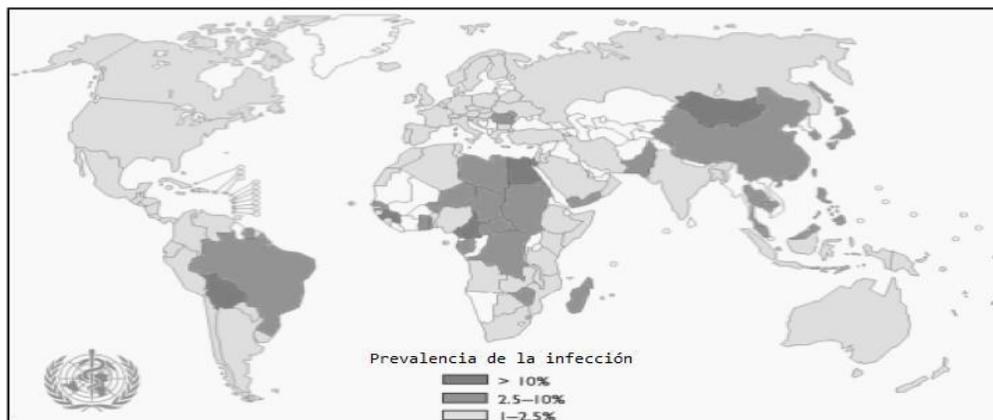


Figura1.1. Prevalencia del VHC a nivel mundial. Figura adaptada de referencia (3). Porcentajes de prevalencia por país indicada en recuadros, la intensidad del color indica donde se encuentra el mayor número de casos.

A dos décadas de su descubrimiento, el virus de la Hepatitis C infecta alrededor del 3% de la población mundial (alrededor de 170 millones de personas), esto representa una pandemia viral⁴. Su prevalencia en países en desarrollo sólo se puede estimar, ya que la mayoría de los estudios son sobre seroprevalencia, y sobre población seleccionada (donadores de sangre, pacientes con enfermedades crónicas del hígado)⁵.



Las causas principales de transmisión de este virus en los países en desarrollo son el uso de drogas inyectables, inyecciones terapéuticas inseguras, y la transfusión, antes de que fuera común el diagnóstico de VHC^{6,7}. En México, se estima que alrededor de 700,000-1,500,000 personas están infectadas por el virus de la hepatitis C⁸.

I.2 Progreso de la enfermedad y Tratamiento

La terapia actual estándar contra la hepatitis C consiste en Interferón α pegilado (IFN- α), administrado una vez por semana, en conjunto con una dosis diaria de ribavirina (RBV) por 24 a 48 semanas⁹. Recientemente, en mayo del 2011 la FDA aprobó dos inhibidores específicos de la proteasa viral del HCV, el Telaprevir y boceprevir, para ser utilizados en combinación con la terapia estándar¹⁰. El interferón es una citosina del sistema inmune innato, sus potentes efectos antivirales se deben a la regulación de cientos de genes estimulados por IFN (IFN-stimulated genes, ISGs). Muchos de estos genes tienen actividad antiviral, pero otros están involucrados en metabolismo de lípidos, apoptosis, degradación de proteínas, y respuesta celular inflamatoria¹¹. La ribavirina es un análogo de la guanosina; es usada contra virus de DNA y RNA¹². Actualmente, se desconocen los mecanismos por los cuales la ribavirina inhibe la replicación del VHC, sin embargo, se han propuesto varios mecanismos que están siendo evaluados¹³:

- La ribavirina al ser fosforilada (ribavirina-5-trifosfato, RTP), inhibe la RNA polimerasa dependiente de RNA del VHC.
- Un metabolito de la ribavirina, el ribavirina-5-monofosfato (RMP), inhibe de manera competitiva a la inosina-5-monofosfato deshidrogenasa (IMPH), la cual al ser inhibida conduce al agotamiento del GTP intracelular necesario para la replicación del VHC.
- Por sus propiedades inmunomoduladoras ya que potencia la producción de citocinas Th1 y Th2.



- Por sus propiedades mutagénicas ya que el RTP es utilizado en la replicación del genoma del virus lo que causa una gran cantidad de errores.

El éxito de la terapia combinada de IFN-RVB está determinado por el genotipo del VHC que infecta al paciente, por ejemplo, en el caso de infección con el genotipo 1B del VHC el aclaramiento viral es de un 50% en promedio por pacientes¹⁴.

El VHC se clasifica de manera filogenética en 6 genotipos (del 1 al 6), cada genotipo se divide en subtipos (de manera alfabética). Los genotipos difieren uno de otro en alrededor del 31-33% de su secuencia nucleotídica, comparada con un 20-25% entre los subtipos. Se ha demostrado que dependiendo de la zona geográfica donde habita el paciente es más probable la infección con algún genotipo de VHC particular¹⁵.

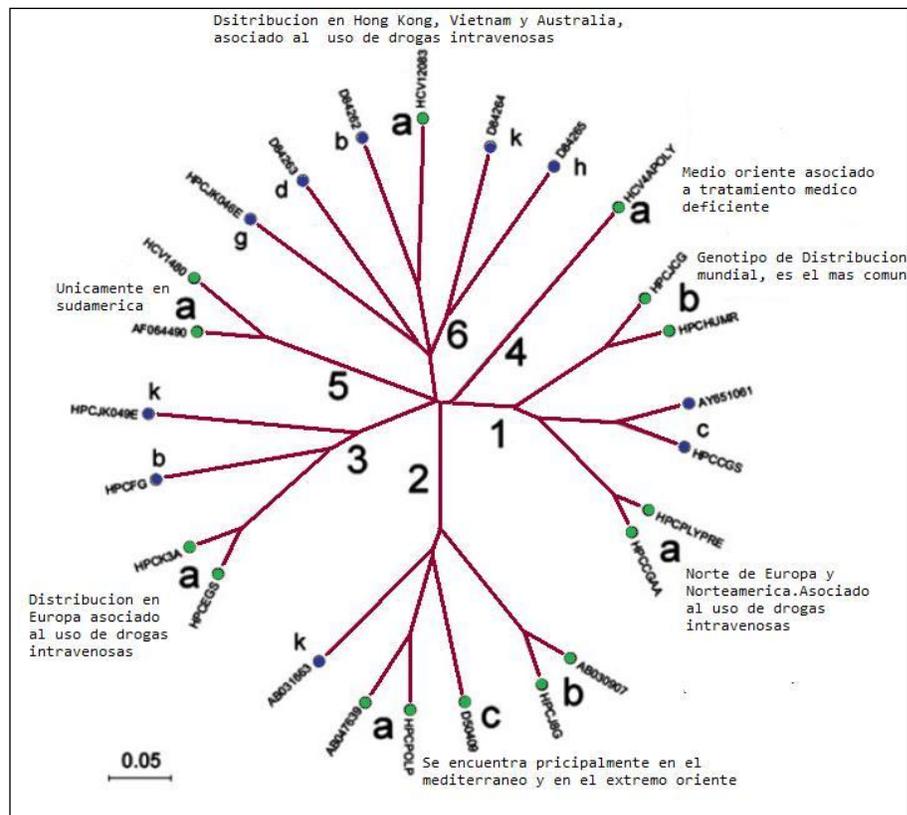


Figura 1.2. Árbol Filogenético del VHC, donde se muestra los genotipos y principales áreas geográficas donde prevalecen Figura adaptada de referencia (14).



Los genotipos más comunes son 1, 2 y 3 en el norte y sur de América, además de Europa; el genotipo 1 es el que tiene una respuesta más pobre al tratamiento con IFN-RBV. El genotipo 4, se presenta de manera más común en el norte de África, en el oriente medio y el África sub-sahariana. El genotipo 5, se reporta para el sur de África, y el genotipo 6 permanece aislado principalmente en el sureste asiático. Las principales investigaciones están dirigidas para los genotipos 1,2 y 3, debido a que son los de mayor prevalencia, ya que se reporta que sólo un 20% de las infecciones en el mundo por el VHC pertenecen a los genotipos 4, 5, y 6¹⁶.

De manera particular, en México, los genotipos mas predominantes son el genotipo 1,2 y 3; los genotipos 4,5 y 6 son poco frecuentes. Los genotipos 1 y 2 presentan una distribución similar en todo el país, y el genotipo 3 tiene una frecuencia mayor en el norte del país¹⁷. En forma más específica, en el noroeste de México (Nuevo León, Tamaulipas, Coahuila y parte de San Luis Potosí), el genotipo mas prevalente es el 1 con un 73%, y le sigue el genotipo 2 y 3 con un 13 y 12%, y el genotipo 4 con 1%. Cabe destacar que el subtipo b (VHC 1b) es el más común y el de menor respuesta al tratamiento de IFN-RBV¹⁸.

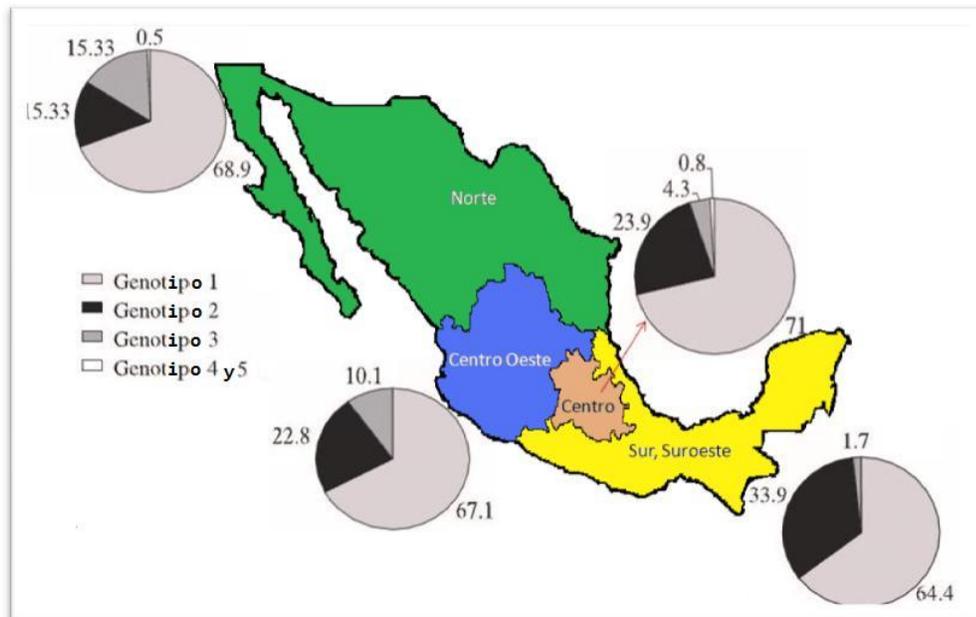


Figura1.3 Distribución de los genotipos del VHC en territorio mexicano dividido en 4 zonas geográficas, los valores dados están en porcentaje.

Figura adaptada de referencia (16).



I.3 Sistemas experimentales para estudiar el Virus de la Hepatitis C

El primer modelo experimental fue el chimpancé, el cual fue utilizado para el descubrimiento del VHC. Posteriormente, se intentó establecer un sistema de cultivo de virus, esto se realizó infectando líneas celulares establecidas y cultivos primarios de hepatocitos, pero no se tuvo éxito, ya que los títulos virales eran bajos. Aun así, se observó que la línea Huh7 (células derivadas de hepatocarcinoma humano) era la más susceptible a la infección¹⁹.

Se intentó un nuevo abordaje para desarrollar un sistema de replicación celular del VHC, éste fue el desarrollo de los sistemas replicón. Se trata de un constructo subgenómico que expresa las proteínas encargadas de la replicación del VHC, lo que le permite replicarse de manera autónoma, además de que es selectivo al llevar el gen de resistencia a la geneticina (G418)²⁰. Se ha demostrado que el aumento en la replicación del replicón del VHC en células Huh7 se debe a mutaciones adaptativas que le permiten replicarse de manera más eficiente *in-vitro*, pero estas adaptaciones no le son útiles *in-vivo*^{21,22}.

Fue hasta el año 2005, que se descubrió a la cepa JFH-1 genotipo 2A, aislada de un caso de hepatitis fulminante. Ésta es la única cepa actualmente que puede replicarse *in-vitro* de manera autónoma, lo que ha permitido obtener información de los diferentes estadios del ciclo de vida del VHC²³.

I.4 Ciclo de vida del Virus de la Hepatitis C.

El VHC es un virus hepatotrópico; se ha reportado la infección de otro tipo de células como los leucocitos, macrófagos, células sinusoidales, entre otras. El VHC entra a las células hepáticas por medio de la endocitosis mediada por clatrina, esto después de que las glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura del virus se unen a receptores de superficie de la



célula hepática²⁴. Muchos receptores de la superficie celular han sido implicados en la entrada del VHC, aunque sólo 4 parecen ser los mas importantes: Cluster de diferenciación 81 (CD81)²⁵, scavenger receptor class B (SR-B1)²⁶, Claudina-1²⁷, y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R)²⁸. CD81 y SR-B1 permiten la entrada del virus por la interacción directa con las proteínas de envoltura E1 y E2. La Claudina-1 es una proteína de unión celular que es esencial para la entrada del VHC a la célula pero que se utiliza después de que el virus tuvo interacción con la célula. LDL-R es el principal receptor del VHC. El VHC se une al LDL-R después de asociarse a LDL u otras lipoproteínas, posiblemente, a través de la afinidad de E2 por los lípidos²⁹.

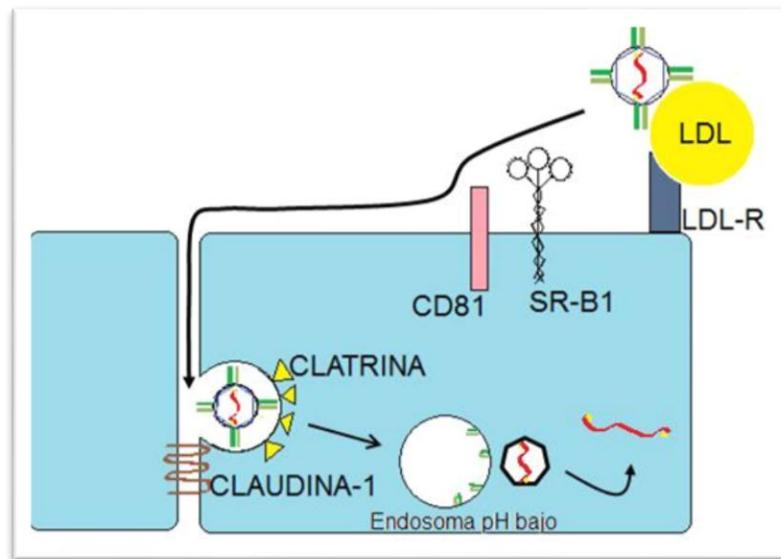


Figura1.4 Entrada del VHC en la célula. Figura adaptada de referencia (23).

Después de la unión inicial y endocitosis, la acidez dentro del endosoma permite la fusión entre la envoltura del VHC con la membrana del endosoma, liberándose la nucleocápside en el citoplasma. La desestabilización de las proteínas de la nucleocápside hace que se libere la cadena positiva de RNA en el citoplasma. El genoma es reconocido y traducido por los ribosomas de la célula, los ribosomas arriban al genoma a través del sitio 5´de entrada interna del ribosoma (IRES:5´ internal ribosome entry site)³⁰. El genoma del virus es policistrónico, con un solo marco de lectura que codifica para diez proteínas que se traducen en una poliproteína, esta poliproteína sufre

modificaciones co-traduccionales y post-traduccionales por proteasas celulares y virales³¹.

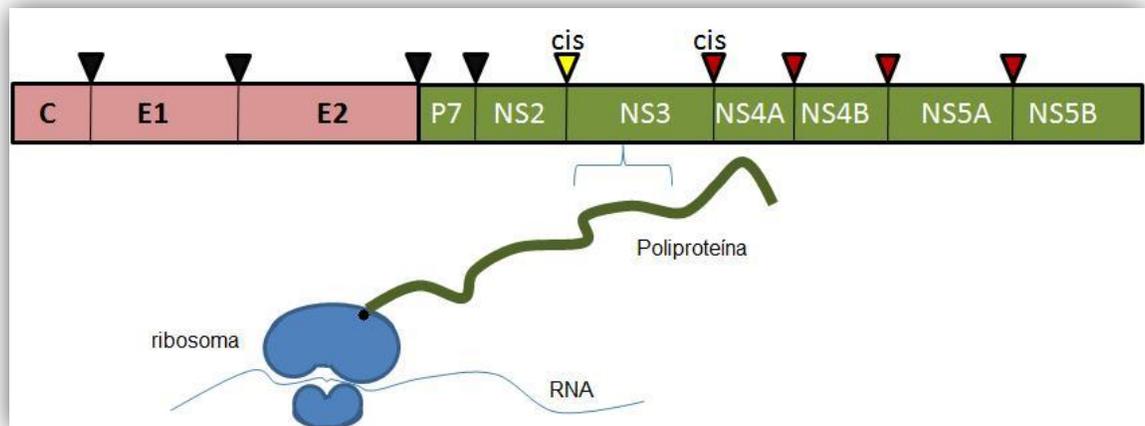


Figura 1.5.- Traducción y procesamiento de la poliproteína. El RNA viral del VHC es traducido en una gran poliproteína, cada proteína individual es producida por cortes de proteasas celulares. Los sitios están indicados con flechas negras, y posteriormente, cortadas por proteasas virales, en amarillo un sitio de corte único por la proteína NS2, y todos los cortes posteriores son realizados por la proteína NS3. Figura adaptada de referencia 30.

En la región N-terminal de la poliproteína, se ubican las proteínas estructurales del VHC, las cuales son liberadas por una peptidasa celular. Los cortes entre las proteínas C/E1 y E1/E2 son muy rápidos, sin embargo, los cortes para E2/p7 y p7/NS2 son más lentos³². Las uniones entre las proteínas NS son cortadas por proteasas virales.

Después del procesamiento de la proteína por las proteasas, las proteínas NS, a excepción de NS2, forman un complejo de replicación unido a la membrana del retículo endoplásmico³³. El complejo de replicación es anclado por interacciones débiles proteína-proteína; la unión de cada proteína a la membrana es esencial para la formación del complejo de replicación³⁴. Todas las proteínas, a excepción de la proteína NS3, poseen dominios transmembranales hidrofóbicos en su extremo amino terminal o carboxilo que les permiten anclarse a la membrana del retículo endoplásmico^{35,36}. La proteína NS5A se asocia a la membrana gracias a que posee una estructura alfa hélice anfipática en su extremo amino³⁷, y la proteína NS5B se ancla a la membrana gracias a un dominio transmembranal en su extremo carboxilo³⁸. La



proteína NS3 está anclada a la membrana del retículo endoplásmico gracias a sus interacciones con la proteína NS4A.

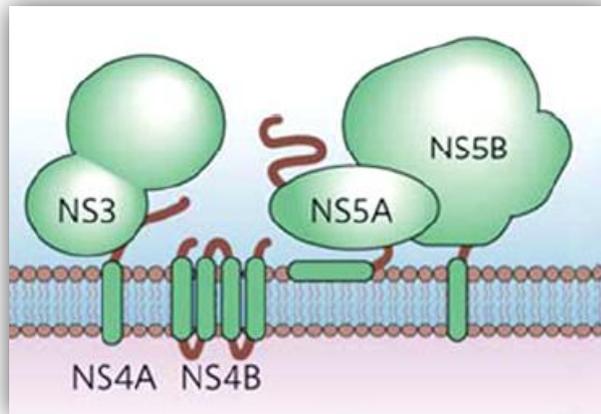


Figura1.6 Topología del complejo de replicación. Figura adaptada de referencia (39).

El complejo de replicación del VHC está formado por las proteínas NS3/4A, NS4B, NS5A y NS5B y se encuentra anclado a membrana del retículo endoplásmico, se desconoce cuántas de estas proteínas forman el complejo de replicación, o si también se incluyen dentro del complejo proteínas de la célula hospedadora^{40,41}. También se desconoce cómo se regulan las actividades de estas proteínas dentro del complejo de replicación. Lo que si se conoce es que la proteína NS3 es una enzima bifuncional que contiene una actividad proteasa y una actividad helicasa que modula la actividad polimerasa de la proteína NS5B y viceversa⁴².

El complejo de replicación es responsable de la reproducción del RNA viral, el cómo las proteínas no estructurales y las proteínas de la célula hospedera lo logran, se sigue investigando. Después o durante la traducción, la proteína de unión a RNA llamada NS5A, se piensa que se une al RNA molde, proveyendo una unión para la replicación⁴³. La proteína NS5B que es una RNA-polimerasa dependiente de RNA, sintetiza una hebra negativa que sirve de intermediario para transcribir nuevas cadenas de polaridad positiva que son usadas como genomas de nuevos virus y como moldes para hacer mas poli-proteínas para el ensamble de nuevos virus⁴⁴. Durante la replicación del RNA, la actividad helicasa de la proteína NS3 y



las helicasas de la célula hospedera se utilizan para desarrollar las estructuras secundarias de los extremos 5' y 3' del genoma de RNA del VHC, así como también para separar la doble cadena de RNA que se forma después de la replicación de este genoma^{45,46}.

La proteína NS4B no parece interactuar de forma directa con el RNA, más bien induce la formación de una red membranosa asociada a la mitocondria, usando la membrana de retículo endoplásmico, la cual sirve como sitio de anclaje para los complejos de replicación^{32,47,48}. El dominio que se encuentra en el extremo amino-terminal de la proteína NS4B, es esencial para la replicación y la correcta inserción de esta proteína a la membrana del retículo endoplásmico recae en el corte hecho por la proteína NS3 al separarla de la poliproteína⁴⁸. Este re-ensamblaje puede ayudar al virus a secuestrar el RNA de doble cadena y a que no sea detectado por la célula hospedera, concentrando las proteínas virales en la red membranosa como un conjunto de fábricas, además, evita la respuesta apoptótica por parte de la mitocondria^{49,50}.

Una vez que hay suficientes proteínas estructurales y genomas en la red membranosa, el ensamble de viriones se puede dar por medio de balsas lipídicas. La proteína estructural C requiere de la modificación por parte de la peptidasa dependiente del péptido señal para poderse integrar a las balsas lipídicas⁵¹. El RNA de polaridad positiva asociado a la proteína C forma la nucleocápside, la cual se encuentra dentro del Retículo endoplásmico, al salir de éste toma su bicapa lipídica y las glicoproteínas E1 y E2. Los virus son liberados posteriormente por la vía secretora de la exocitosis. La pequeña proteína p7 forma un canal iónico en la membrana del retículo endoplásmico y ésta es esencial para el ensamble del virus y su secreción^{52,53}. Se ha demostrado que la proteína p7 se une de manera específica a la proteína C, y la interrupción de esta interacción detiene la replicación⁵⁴. La proteína NS2 también es esencial para la formación del virus debido a que su actividad proteasa permite su auto-liberación de la poliproteína⁵⁵. También se ha demostrado que la proteína NS5A interactúa con la proteína C y otras proteínas de la célula hospedera fosforilando para facilitar el ensamble viral⁵⁶.

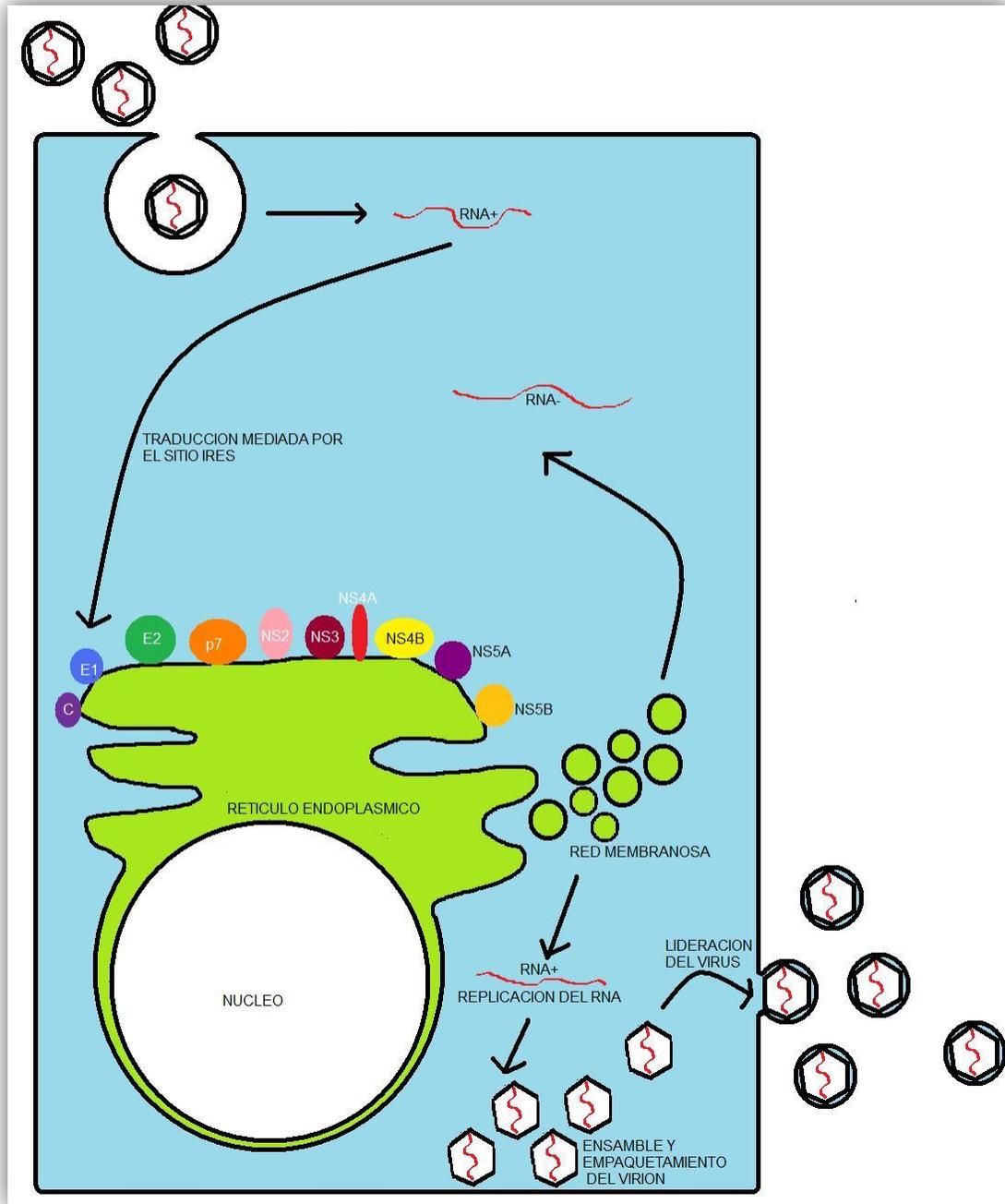


Figura 1.7 Las diferentes etapas del ciclo de vida del VHC. Figura adaptada de referencia 57.



I.5 La proteína NS3/4A

La proteína NS3 posee un dominio serin-proteasa en el extremo amino terminal, así como también un dominio helicasa en el extremo carboxilo terminal, ambos se encuentran separados por una región de unión flexible⁵⁸. No hay evidencia que indique que estos dominios se encuentren separados durante el ciclo de vida del VHC y hay evidencia de que se regulan mutuamente. Se ha demostrado que el dominio proteasa de la proteína NS3 aumenta la actividad NTPasa y helicasa^{59,60}. Por otra parte, también se ha demostrado que mutaciones en el dominio helicasa de esta proteína alteran la inhibición de la actividad del dominio proteasa^{61,62}.

El dominio helicasa de la proteína NS3 pertenece a la familia DExD/H box, esta familia comprende proteínas capaces de desenrollar dobles cadenas de DNA y RNA^{63,64}. Este dominio funciona como un oligómero, y desenrolla RNA a través de un mecanismo de movimiento de gusano acoplado a ATP. Se ha demostrado también que esta proteína interfiere con la función de proteína cinasa A, que es un regulador del metabolismo que activa factores de transcripción de manera dependiente del AMP cíclico, esta interferencia se debe al uso continuo de ATP por parte de la helicasa, haciéndolo un sustrato escaso.^{65,66}

También se ha encontrado que el dominio proteasa de la proteína NS3 interactúa y modula proteínas de la célula hospedera⁶⁷. El dominio proteasa es capaz de unir la proteína supresora de tumores (p53), esto inhibe la función transactivadora de la proteína p53 por lo cual interfiere en la apoptosis y permite el desarrollo del hepatocarcinoma. Se ha demostrado que el dominio proteasa incrementa la actividad de la vía secretora de la célula a través de la interacción con ELKS δ y ELK α ⁶⁸. Además, este dominio proteasa es capaz de detener la función del inmunoproteosoma a través de la interacción con LMP7 (low-molecular-mass protein 7), el cual provee de péptidos derivados de la destrucción de la poliproteína del VHC que son utilizados para anclarlos sobre el complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (MHC-1). Los diferentes papeles que juega la proteína NS3 en la replicación viral y modulación de la



respuesta celular la hacen una diana terapéutica muy interesante.

La primera estructura cristalina del dominio proteasa de la proteína NS3 fue obtenida en 1996. Esta estructura revelaba un plegamiento parecido a la quimotripsina, con dos barriles beta y una molécula de zinc en su estructura⁶⁹. La estructura cristalina muestra un sitio activo inusualmente expuesto y extendido en la superficie, lo cual explica las observaciones bioquímicas de que el péptido sustrato para este dominio requiere como mínimo diez aminoácidos para realizar el corte^{70,71}. Una característica importante de esta proteína es que la triada catalítica no está alineada, por lo cual, la proteína NS3 carece de actividad, al unirse la proteína NS4A a la proteína NS3 se alinea la triada catalítica, activándose el dominio proteasa⁷².

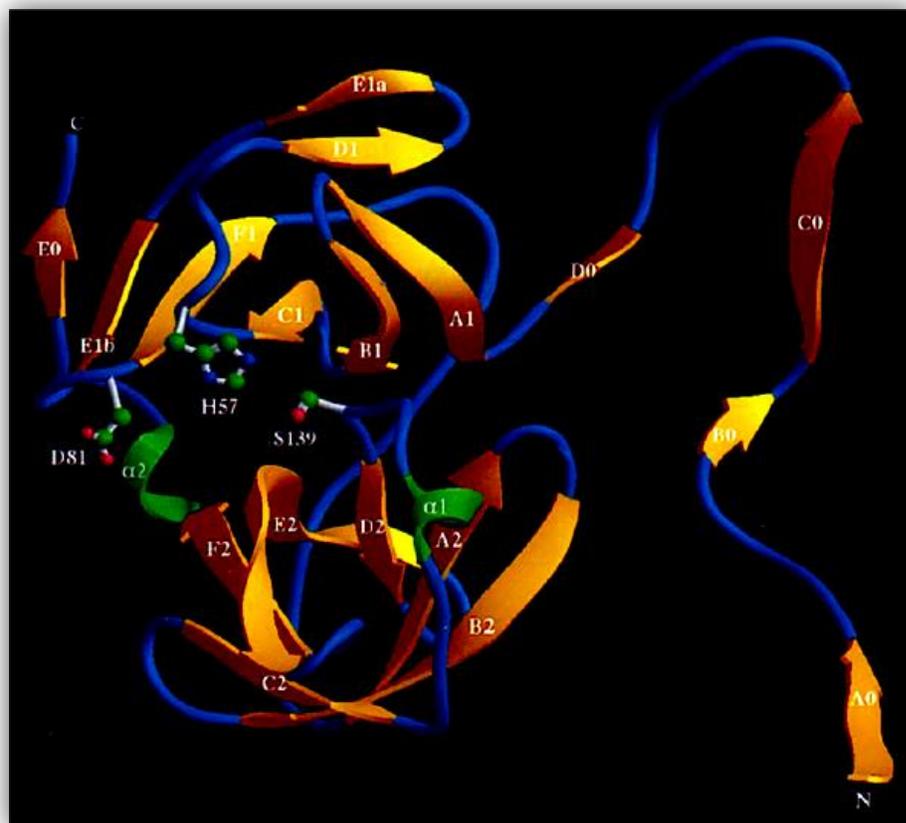


Figura1.8 Estructura cristalina del dominio proteasa de la proteína NS3. Las láminas beta se muestran en color naranja y las alfa-hélices en color verde, los aminoácidos catalíticos se muestran como esferas y palillos. Figura tomada de referencia 70.



La proteína NS4A es una proteína pequeña de 54 aminoácidos con diversas funciones. Es importante para la regulación de la fosforilación de la proteína NS5A⁷³, y es capaz de inhibir la traducción a través de interacción con el factor de elongación eucariota 1A⁷⁴. Cuando se expresa sola, la proteína NS4A se ha localizado en la mitocondria e induce un estrés oxidativo asociado a este organelo. El estrés oxidativo asociado a la mitocondria es el aumento de radicales libres del oxígeno a causa de la interrupción de la cadena respiratoria, por tanto, es un precursor de daño celular y cáncer⁷⁵.

La proteína NS4A tiene tres dominios: 1) Un dominio transmembranal que se encuentra en su extremo amino terminal, 2) un dominio que interactúa con la proteína NS3, formando un heterodímero, y 3) un dominio de 20 aminoácidos hidrofílicos que forman una estructura alfa hélice que puede interactuar con aminoácidos básicos⁷⁶. Se ha demostrado que el dominio que interactúa de manera directa con la proteína NS3 (dominio 2) activa al dominio proteasa⁷⁷.

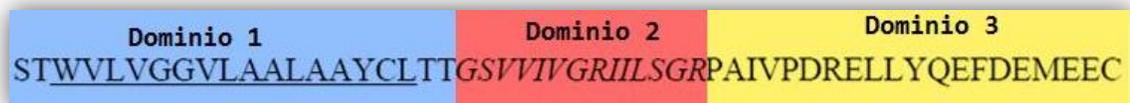


Figura 1.9 Secuencia de la proteína NS4A. En esta figura se representan la estructura primaria de la proteína NS4A y además se indican los diferentes dominios. Figura adaptada de referencia 70.

En resumen, las funciones de la proteína NS4A son localizar, estabilizar y activar a la proteína NS3. La proteína NS4A potencia la eficiencia de corte de la proteasa NS3, además es estrictamente necesaria la formación del complejo NS3-NS4A para hacer el corte de la poliproteína en la unión NS4B/NS5A. La región central de la proteína NS4A se integra dentro del dominio amino-terminal del barril beta de la proteína NS3, y el extremo amino-terminal de la proteína NS3 se pliega sobre la proteína NS4A. Estos cambios resultan en que un barril beta plegado de 6 hebras se vuelva de 8 hebras. De esta manera, el plegado de la región amino-terminal de la proteína NS3 mueve la hebra que contiene dos aminoácidos de la triada catalítica hacia el sitio



activo, acercándolos hacia el ácido aspártico, estabilizándose entonces la triada catalítica en una conformación activa⁷⁸.

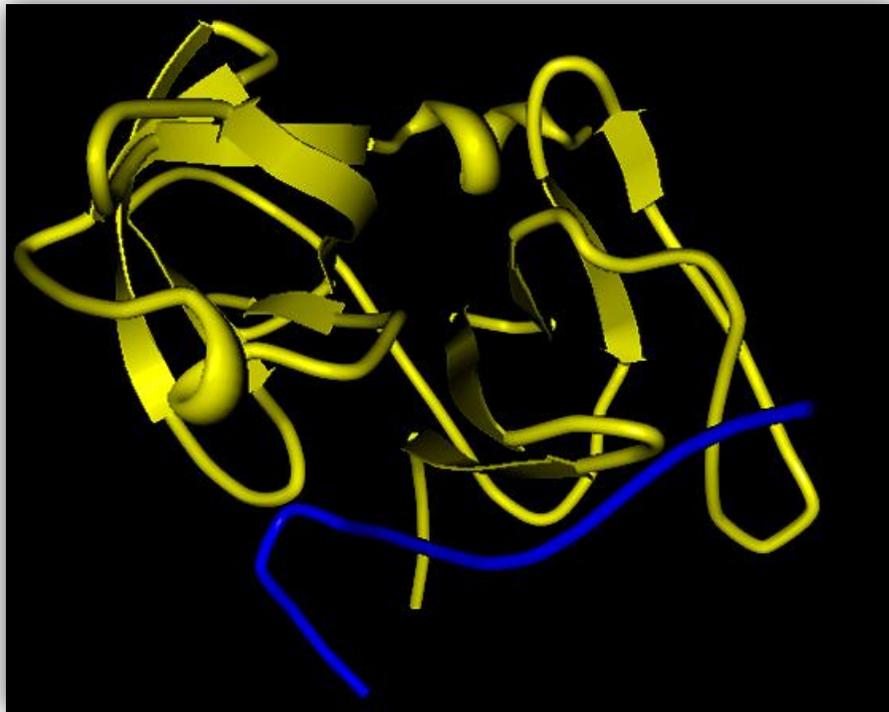


Figura1.10 Estructura cristalina de la proteína NS3/4A. De color amarillo se observa el dominio proteasa de la proteína NS3 y de color azul la proteína NS4A. Figura adaptada de referencia 79.

I.5.1 Evasión inmune por la proteína NS3/4A

El complejo NS3/4A está implicado en la evasión inmune gracias a la proteólisis de dos proteínas celulares que están involucradas en la señalización de la respuesta inmune innata: la proteína adaptadora asociada al dominio *TIR* inductora de *interferón- β* (TRIF) y proteínas de señal antiviral mitocondrial (o MAVS; también conocidas como CARDIF, IPS-1 y VISA)^{79,80}. Las moléculas TRIF y MAVS intervienen río abajo en la señalización por parte del receptor tipo toll 3 (TLR-3) y al gen inducible por el ácido retinoico (RIG-1), respectivamente. El TLR-3 reconoce RNA de doble cadena en el exterior de la célula y en los endosomas, y el RIG-1 en el citoplasma de la célula, ambos



desencadenan una señal antiviral a las células adyacentes que inhibe la propagación del virus⁸¹.

Se ha reportado que una pequeña fracción de la proteína NS3/4A se ubica en la mitocondria⁸², actuando sobre las proteínas MAVS que se encuentran en la membrana externa de la mitocondria. Sin embargo, el procesamiento de TRIF que es una proteína en la membrana de los endosomas, aun se desconoce.

I.5.2 Inhibidores de la actividad proteasa de la proteína NS3/4A

Los inhibidores de la actividad proteasa son unos de los terapéuticos antivirales más exitosos. En el caso de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la investigación ha permitido el desarrollo de muchos inhibidores de la actividad proteasa que actualmente se encuentran en el mercado. La determinación de la especificidad de sustrato y el mecanismo catalítico permite el diseño de análogos peptidomiméticos y⁸³, la determinación de la estructura cristalina permite que mas fármacos sean diseñados para que inhiban la actividad proteasa⁸⁴.

La proteína NS3 es el primer objetivo debido a que se trata de una proteína esencial para la replicación viral y ayuda a evadir la respuesta inmune por su capacidad de escindir a las proteínas TRIF y MAVS. La actividad proteasa de la proteína NS3 es requerida para liberar a las proteínas NS4A, NS4B, NS5A y NS5B de la poliproteína. Así, la inhibición de la actividad proteasa de la proteína NS3 previene la maduración de las proteínas no estructurales del virus, las cuales son necesarias para la replicación, e inhibe la progresión de la infección. También, la inhibición de la actividad proteasa de la proteína NS3 permite que la cascada de señales que envían TRIF y MAVS se mantenga, por lo cual, habrá una respuesta inmune contra el VHC. En el año 2000, se demostró en chimpancés infectados con el VHC, que cuando la proteína NS3 era catalíticamente inactiva, la infección no se desarrollaba⁸⁵. Desafortunadamente, la proteína NS3/4A es una difícil diana terapéutica debido a una característica estructural de su sitio activo, es demasiado superficial y expuesto, además, requiere como mínimo hacer interacción con diez aminoácidos para que el sustrato sea reconocido de manera correcta por el sitio activo.



I.5.2.1 Acido Acetilsalicílico como tratamiento contra el VHC.

Desde 1995 se tenía la idea de que el ácido acetilsalicílico podría ser un coadyuvante en el tratamiento contra la Hepatitis C, la hipótesis propuesta por grupo de investigación del Dr. Heinrich, era que al utilizar el ácido acetilsalicílico como co-tratamiento contra la hepatitis C aumentaba la actividad del interferón, esta hipótesis fue establecida gracias al trabajo propuesto en 1991 por Hannigan and Williams sobre la transducción de señales por parte del interferón tipo I en fibroblastos en el cual llegan a la conclusión de que ocurre gracias al ácido araquidónico, en donde muestran que la inhibir la ciclooxigenasa se intensifica la actividad del interferón^{86,87}.

En el 2001 Liao y colaboradores, demostraron la capacidad del ácido acetilsalicílico y de los salicilatos de inhibir la replicación de los flavivirus, este grupo tenía la hipótesis que los Flavivirus utilizaba la vía de señalización NF- κ B para replicarse y provocar apoptosis, de manera que utilizaron el ácido acetilsalicílico para inhibir esta vía, observando una disminución en la replicación de ciertos flavivirus, al final utilizaron inhibidores específicos de la vía de señalización NF- κ B observándose que la replicación no se afectaba; llegando a la conclusión que el efecto en la replicación de los flavivirus se debe a la activación parcial de p38 MAPK por el ácido acetilsalicílico⁸⁸.

De manera específica en 2008 Rivas y colaboradores, trabajan sobre la inhibición de la replicación del VHC por el ácido acetilsalicílico, llegando a la conclusión vista por Liao y colaboradores en el 2001, en que la inhibición de la replicación del VHC se debe a la activación de la vía COX-2/MEK1/2/p38 MAPK, observándose que se inhibe la expresión a nivel proteico y de RNA de las proteínas virales, y que este depende del tiempo de exposición al ácido acetilsalicílico⁸⁹.



CAPITULO II. JUSTIFICACION

La infección crónica por el virus de la hepatitis C aflige alrededor del 3% de la población mundial. El tratamiento actual es la combinación de interferón alfa pegilado y ribavirina; el cual sólo es efectivo en el 50% de los casos; además, está asociado a efectos secundarios indeseables. Es por esto que son necesarias alternativas de tratamiento. Una de ellas es afectar la actividad de la proteasa-helicasa NS3/4A, la cual es esencial para la replicación del VHC.



CAPITULO III. OBJETIVOS

III.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del ácido acetilsalicílico sobre las actividades de la proteína NS3/4A del VHC

III.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la concentración mínima de ácido acetilsalicílico que afecte la (s) actividad(es) de la proteína NS3/4A
2. Determinar su constante de inhibición o activación para las dos actividades de la proteína NS3/4A
3. Determinar si es un inhibidor/activador reversible o irreversible
4. Evaluar la actividad de la proteasa-helicasa en células Huh7 replicón tratadas con aspirina, a una concentración en la que existe disminución en la replicación del virus



CAPITULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. ÁREA FÍSICA

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Terapia Celular, y en el laboratorio de Infectología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

IV.2. ORIGEN DE LOS REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO

A continuación se detallan los reactivos, el material y el equipo que se utilizó para el desarrollo del proyecto, así como las casas comerciales donde fueron adquiridos.

IV.2.1 REACTIVOS

IV.2.1.1 Reacciones enzimáticas

Para las reacción enzimáticas en donde se midió la actividad proteasa, se utilizó la proteína NS3/4A proteasa del VHC genotipo 1b, y el sustrato fluorescente que simula el sitio de corte entre la proteína NS4a-NS4b; ambos reactivos de la compañía ANASPEC. Debe mencionarse que estos péptidos sustrato poseen en cada extremo amino y carboxilo una modificación. En el extremo amino hay una molécula fluorescente que emite a una longitud de onda de 560 nanómetros; y en el extremo carboxilo una molécula quencher que absorbe emisiones con una longitud de onda de 560 nm. Cuando el péptido se encuentra de manera íntegra, ambas modificaciones se encuentran muy cerca, anulando



la fluorescencia del péptido. Solo se percibe un aumento en la fluorescencia después de que el péptido ha sido cortado por la proteasa NS3/4A, pues ambos extremos se separan permitiendo que la molécula fluorescente pueda emitir sin ninguna interferencia.

- Sensolyte[®] 490 HCV Protease Assay Kit *Fluorimetric*Kit Size: 200 assays. Número de catálogo 72087
- HCV NS3/4A Protease Substrate Hydrolysis Product 1. Número de catálogo 60978
- HCV (Hepatitis C Virus) NS3/4A Protease Substrate. Número de catálogo 60798.
- CHAPS 98% Sigma Aldrich. Número de catálogo C3023 - CHAPS
- DTT (DL-Dithiothreitol), Sigma Aldrich. Número de catálogo D0632 - ≥98% (TLC), ≥99% (titration)
- Trizma[®] hydrochloride (TRIS HCl)Sigma Aldrich. Número de catálogo 93363 BioUltra, for molecular biology, ≥99.0% (AT)

En el caso de las reacciones para la actividad helicasa, la proteína utilizada fue obtenida de membranas celulares de la línea celular Huh7 replicón, y se utilizaron los siguientes primers modificados⁹⁰.

- 5´Cy3/GCTCCCAATCGATGAACGGGGAGC´3BHQ_2
- 5´GCTCCCGTTCATCGATTGGGGAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTT´3

Estos dos primers tienen como característica el hecho de que si no están apareados uno con el otro de manera complementaria, se pueden plegar sobre sí mismos formando bucles y horquillas muy estables. Esta formación de horquillas es de particular importancia para el primer modificado ya que en cada uno de sus extremos contiene una modificación. En el extremo cinco prima posee una molécula fluorescente a 560 nanómetros, y en el extremo tres prima una molécula quencher (apagadora) específica para 560nm. Esto significa que cuando los oligómeros están apareados de forma complementaria, existe una señal a 560nm. Al momento de separarse, por acción del calor o de una helicasa, se pliegan sobre sí mismos. En el caso del oligómero modificado se unen los extremos cinco y tres prima, lo que provoca que la molécula quencher disminuya la emisión a 560nm.



IV.2.1.2 Cultivo celular

Los procedimientos de cultivo celular se realizaron en una campana de flujo laminar clase II. En el mantenimiento de las líneas celulares se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), DMEM Advanced, L-glutamina (200mM;100X), suero bovino fetal (SBF), tripsina-EDTA (1X), antibiótico penicilina-estreptomicina (100UI/ml de penicilina G de sodio y 100µg/ml de sulfato de estreptomicina), solución de aminoácidos no esenciales 10mM (100X) y geneticina (sulfato G-418) de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA).

El material de plástico que se utilizó en el cuarto de cultivo incluyó tubos falcon de 15 y 50ml, botellas de 25 y 75cm², placas de cultivo de 35mm x 10mm, rapadores de células, pipetas desechables de 2,5 y 10ml de la marca Corning (Corning, NY, USA)

IV.2.2 EQUIPOS

- Lector Multi-modal de microplacas Synergy HT de Biotek
- Fluorómetro Versafluor de Biorad
- Campana de flujo laminar Nuaire
- Revco Frezzer ULT1340-3-D14
- Termociclador Tube GeneAmp® PCR System 9700 de Applied Biosystems
- Centrífuga Eppendorf 5403
- Microcentrífuga Eppendorf 5415
- Ultracentrífuga Biofuge Stratos de Heraeus instruments
- Micro pipetas Eppendorf de volumen variable

IV.3. MÉTODOS

Para poder analizar el efecto de un fármaco sobre la actividad de una enzima se debe desarrollar una metodología. En este trabajo se utilizaron dos metodologías utilizadas con anterioridad, modificadas a nuestros requerimientos.

Para el método proteasa se modificó el experimento propuesto por Xiohe y colaboradores en el 2005⁹¹, el cual utiliza la proteína NS3/4A de Anaspec y, CHAPS 1%, glicerol al 15%, 30mM de DDT y como amortiguador TRIS 50mM a pH 7.5. Todo a temperatura ambiente. En nuestro caso, la temperatura utilizada para los ensayos de la actividad proteasa fue de 25°C, no se utiliza una temperatura más alta por la evaporación del DTT y por qué las reacciones se configuraron para una placa de 90 pozos con un volumen cada uno de 100µL. El tiempo de incubación es de 30 minutos y el tiempo de reacción es de 30 a 60 minutos.

La Metodología general se presenta de manera grafica y para cada uno de los objetivos de la actividad proteasa y helicasa.



Figura 4.1 Diagrama de flujo general para medir las actividades de la proteína NS3/4A.

Metodología para la actividad proteasa

Para obtener la constante de Michaelis-Menten para la actividad proteasa se realizó el siguiente experimento:

Se colocaron 5 nanogramos de la proteasa NS3/4A de la marca Anaspec, posteriormente, se agregaron diferentes concentraciones

de sustrato a cada pozo de la placa, empezando por $0.78\mu\text{M}$ y aumentando la concentración a la mitad hasta llegar a $10\mu\text{M}$ de sustrato en el ultimo pozo (ver Figura 4.2). Los resultados de este experimento fueron graficados por el método de doble recíprocos o Lineweaver-Burk.

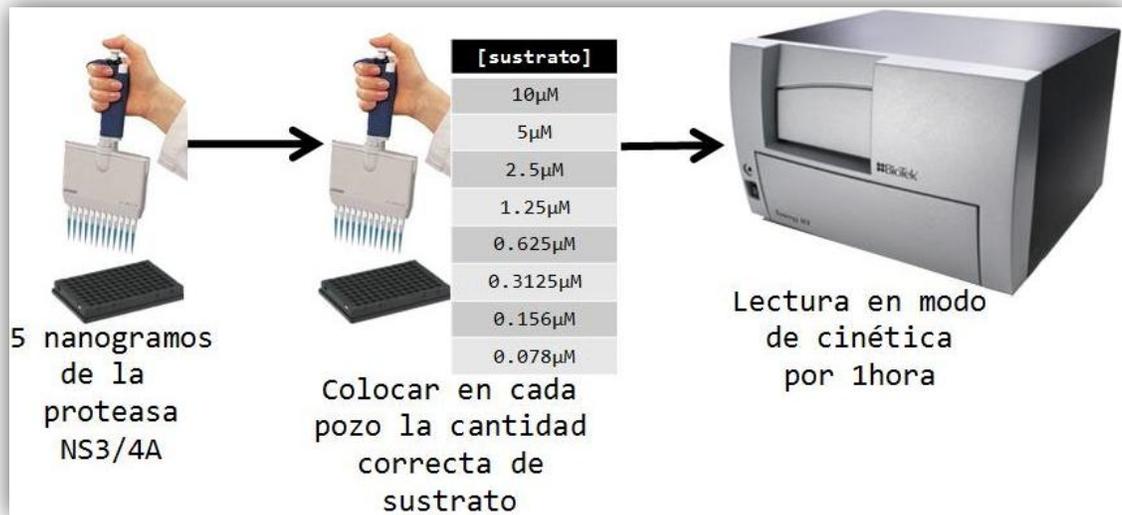


Figura 4.2 Diagrama de flujo para realizar el experimento para calcular la constante de Michaelis-Menten.

Para llevar a cabo el objetivo número 1, que fue determinar la concentración mínima de ácido acetilsalicílico que afecte a la actividad proteasa de la proteína NS3/4a, realizamos el siguiente experimento:

Se colocaron 5 nanogramos de la proteasa NS3/4A de la marca Anaspec en cada pozo, posteriormente, se agregaron diferentes concentraciones de ácido acetilsalicílico empezando por 0.03mM hasta llegar a 16mM a cada pozo de la placa. Se dejó en incubación por un periodo de 15 minutos y, posteriormente se agregó el sustrato a una concentración de 600nM (ver Figura 4.3). El experimento tuvo una duración de 60 minutos. Para la preparación de todos los reactivos, se utilizó el amortiguador antes mencionado.



Figura 4.3 Diagrama de flujo del objetivo número 1. En esta figura se desglosa el procedimiento que se siguió para realizar el primer objetivo específico.

Para comprobar los resultados del objetivo número uno, se realizaron dos experimentos más en los que se modificó primero el tiempo de duración de la reacción y en otro experimento se modificó la concentración del sustrato.

Para observar si el tiempo de la reacción era la limitante en el efecto observado para el ácido acetilsalicílico, se realizó el siguiente experimento: se colocaron 5 nanogramos de la proteasa NS3/4A en cada pozo, posteriormente, se agregaron diferentes concentraciones de ácido acetilsalicílico empezando de 0.03mM hasta llegar a 16mM a cada pozo de la placa, se incubó por un periodo de 15 minutos y posteriormente, se agregó el sustrato con una concentración de 600nM (ver Figura 4.3). El experimento tuvo una duración de dos horas. Este experimento es igual al del primer objetivo, sólo varía en el tiempo de reacción.

En el caso de que el sustrato sea la limitante para observar el efecto del AAS sobre la proteína NS3/4A, se siguió la siguiente metodología: se colocaron 5 nanogramos de la proteasa NS3/4A en cada pozo, posteriormente, se agregó una concentración definida de ácido acetilsalicílico de 2mM a cada pozo de la placa. Se incubó por 15 minutos y, posteriormente, se agregaron tres diferentes concentraciones de sustrato, desde 1.5 μ M hasta la concentración máxima de 20 μ M (ver Figura 4.4). El experimento se realizó a 25°C y tuvo una duración de 60 minutos.

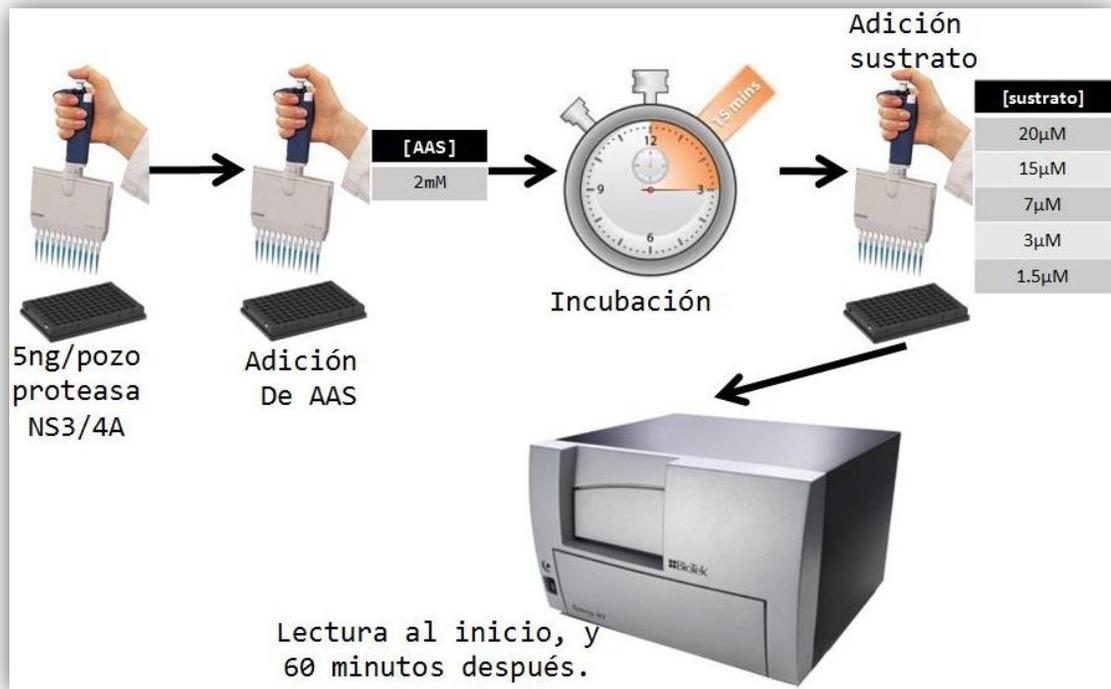


Figura 4.4 Diagrama de flujo que indica los pasos que se siguieron para el experimento donde se comprueba si el sustrato es el reactivo limitante para observar el efecto del AAS sobre la proteína NS3/4A.

Se debe mencionar que para la actividad proteasa de la proteína NS3/4A sólo se llevaron a cabo el objetivo uno y el objetivo cuatro; esto debido a los resultados obtenidos, los cuales anulan los objetivos específicos dos y tres de la metodología.

Para realizar el objetivo cuatro se realizó un procedimiento previo que será descrito a continuación. Primero fue la obtención de membranas de células Huh7 replicón bajo tratamiento de ácido acetilsalicílico con las concentraciones

siguientes: 0mM, 2mM, 4mM y 6mM; esto para obtener la proteína NS3/4A y observar si se ve afectada por este tratamiento.

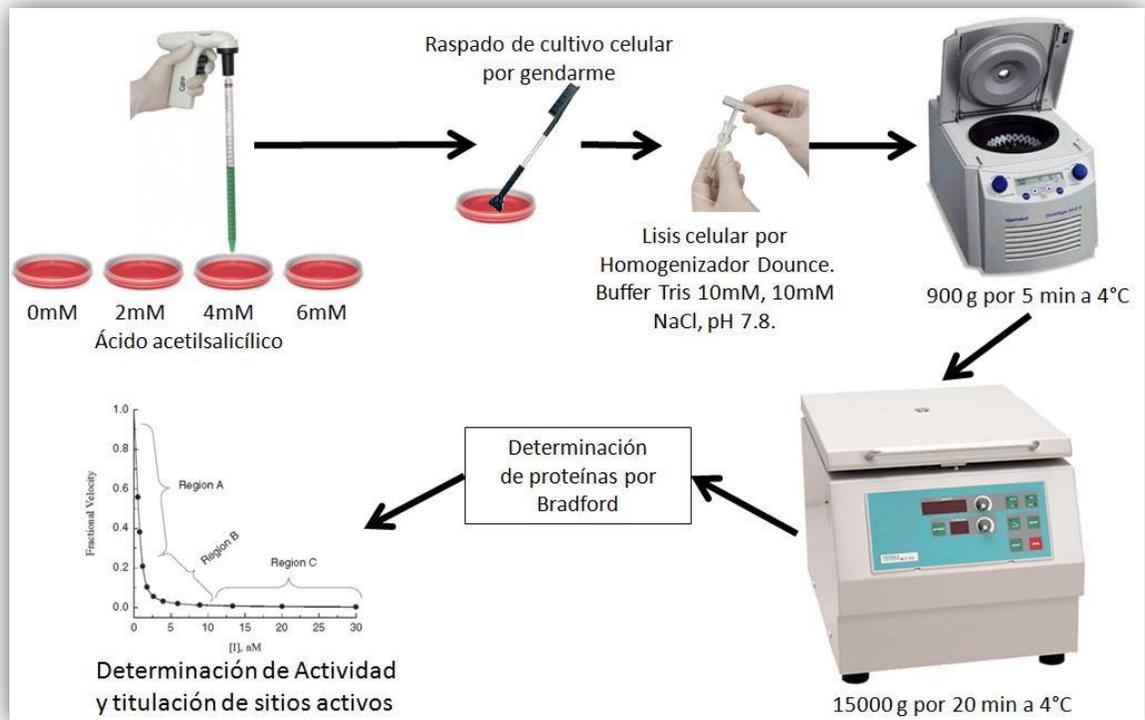


Figura 4.5 Diagrama de flujo para obtención de complejo NS3/4A-membrana de células Huh7 replicón. Las células después de llegar a la confluencia son lisadas a través de un homogeneizador Dounce y a través de centrifugación son separadas de sus organelos.

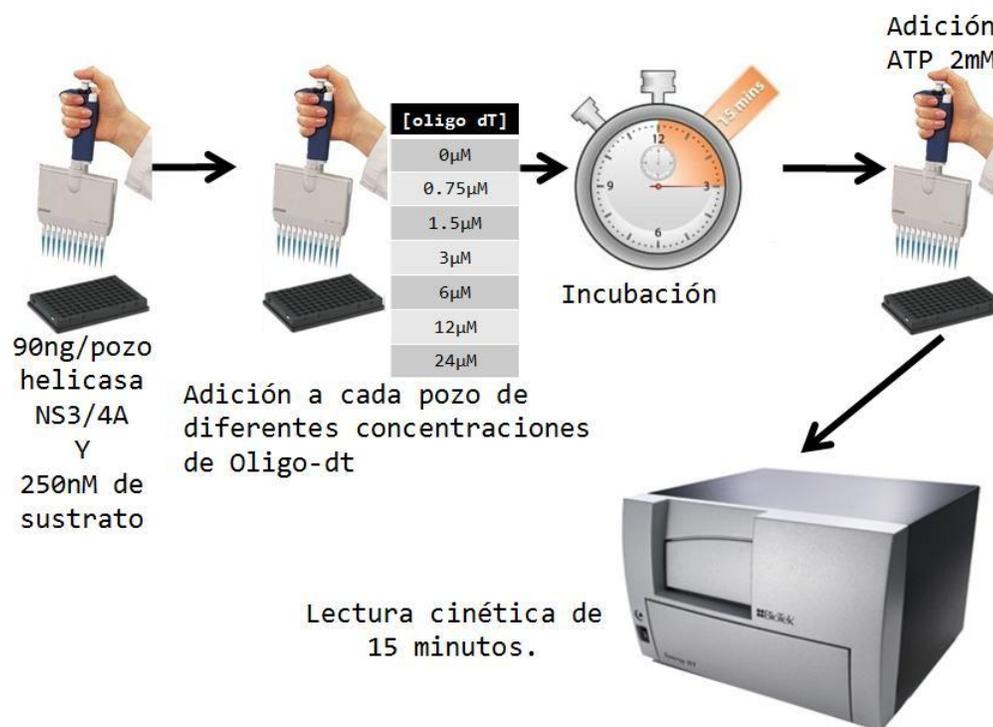
Debe mencionarse que esta última metodología fue utilizada al mismo tiempo para la actividad helicasa; la diferencia radica en que al momento de medir la actividad se utilizó un sustrato distinto.

Metodología para la actividad helicasa

Para medir la actividad helicasa, el primer objetivo fue obtener el dominio helicasa de la proteína NS3/4A de las células Huh7 replicón, esto debido a que no existe de manera comercial como proteína recombinante (figura 4.5). Posteriormente, se realizó una determinación de proteínas de este extracto de membranas, y además, se hizo una titulación de sitios activos. Es la misma metodología de la figura 4.5 con la diferencia en que no se utilizó ácido acetilsalicílico, solamente se dejaron crecer las células hasta alcanzar la confluencia deseada.



La determinación de sitios activos se realizó de la siguiente manera: se utilizaron 90 nanogramos/pozo de proteína proveniente del extracto de membranas de las células Huh7 replicón. Posteriormente, se le agregó 250nm de sustrato que en este caso son los oligomeros que se describen en reactivos. Y también se le agrega el inhibidor, que en este caso es el oligo dT el cual compite por el sitio activo. Se dejó en reposo por 15 minutos y, posteriormente, se le agregó 2mM de ATP. Esto inmediatamente inició la reacción, por lo cual se debe leer a modo de cinética por 15 minutos a 560nm. Se realizó un barrido de concentraciones de inhibidor (oligo dT) desde 0 μ M hasta 24 μ M.



La metodología utilizada para obtener el objetivo número uno de la actividad helicasa, se realizó el siguiente experimento: se utilizaron 5ng pozo de la helicasa activa NS3/4A. Posteriormente a cada pozo de la placa se le agregó 250nM de sustrato en este caso son dos oligonucleotidos o cebadores complementarios que tiene un molécula fluorescente unida. Después del paso anterior se agrega diferentes concentraciones de ácido acetilsalicílico y se deja reposar por 15 minutos, inmediatamente se agrega después de la incubación un

volumen de buffer con ATP que de cómo resultado final una concentración de 4mM, posterior a este paso hace una lectura tipo cinética por 15 minutos.

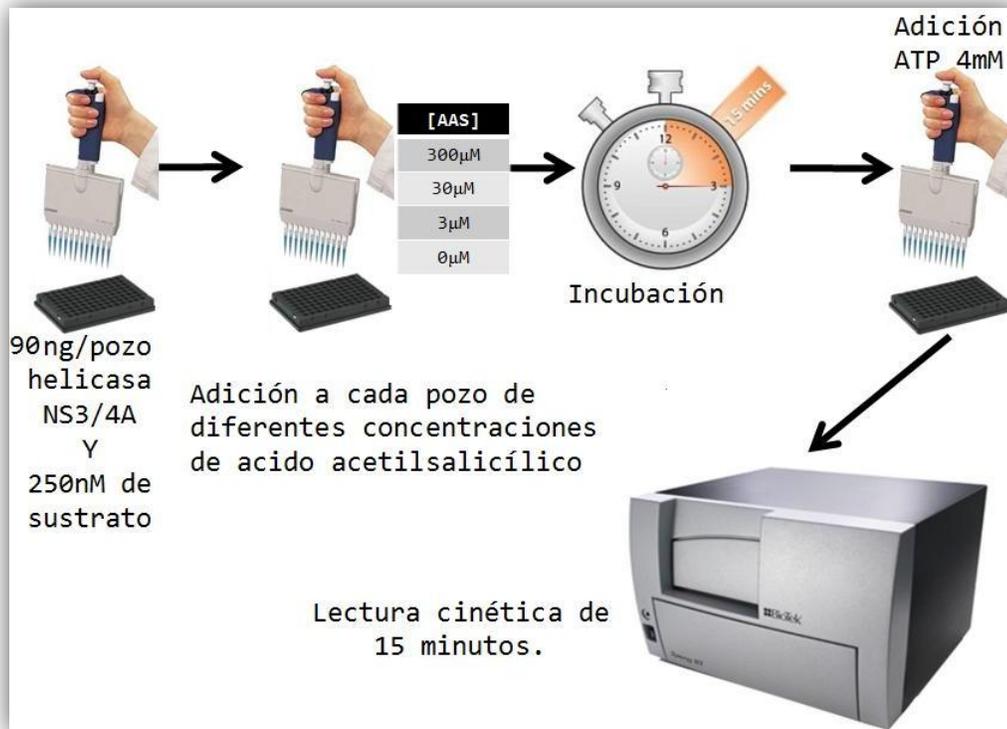


Figura 4.6 Diagrama de flujo del objetivo número uno para medir la actividad helicasa bajo diferentes concentraciones de ácido acetilsalicílico.

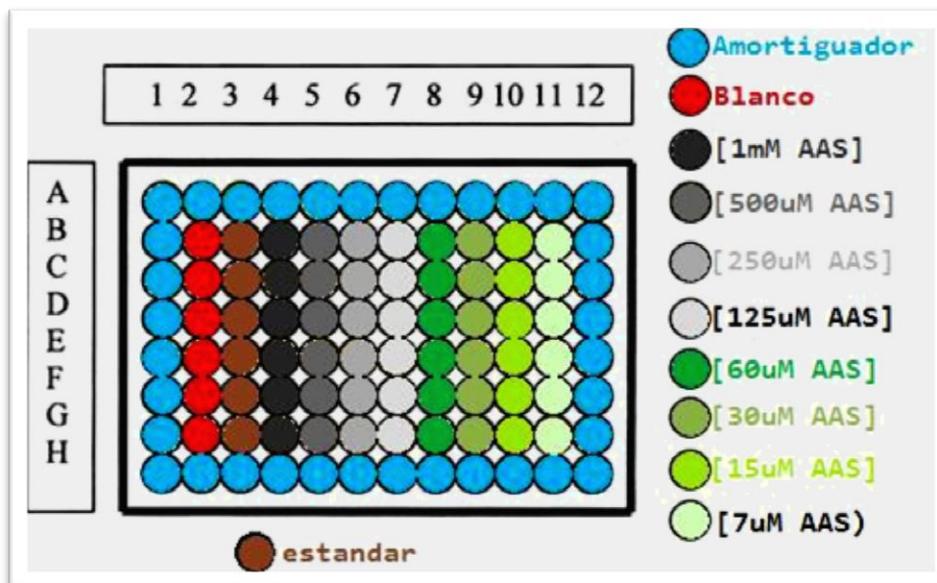


Figura 4.7 Configuración de placa de 96 pozos. Este es un ejemplo de cómo se configuro una placa de para cada experimento, se debe destacar que los pozos de las líneas más externas se llenaron con amortiguador para evitar un problema de evaporación de solvente.

IV.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una prueba estadística de t-student para muestras independientes cuando se conocía un valor de actividad dado por la literatura o con el blanco o el control. Y se realizó una prueba estadística de t-student para muestras relacionada, cuando era la comparación de una misma muestra en un tiempo cero con un tiempo “n”.

CAPITULO V. RESULTADOS

Resultados actividad proteasa

Como antecedente a nuestra hipótesis de que las actividades de la proteína NS3/4A serían afectadas por ácido acetilsalicílico, se realizó una prueba de docking utilizando las estructuras cristalográficas reportadas en la extensión PDB (extensión de archivo relacionada al Protein Data Bank). En el primer experimento de Docking se utilizó la imagen de la estructura cristalina del dominio proteasa de la proteína NS3/4A y la molécula del ácido acetilsalicílico, dando como resultado la estructura que se representa en la figura 5.1.

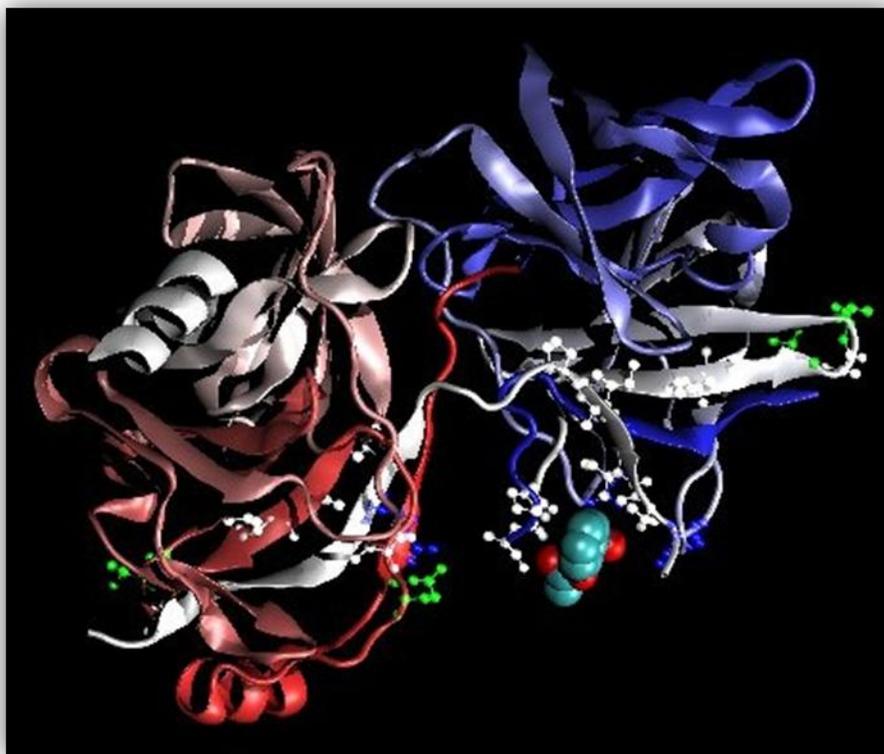


Figura 5.1 Resultado en imagen de análisis de docking entre la proteína NS3/4A y el ácido acetilsalicílico. Realizado en el Molecular Docking Server. <http://www.molecularstation.com/>

Posterior a este experimento *in silico*, se realizó una prueba de docking con la proteína NS3 y el ácido acetilsalicílico, obteniéndose el resultado de la figura 5.2. En esta figura se mencionan los diferentes aminoácidos con los que posiblemente interactúa el ácido acetilsalicílico.

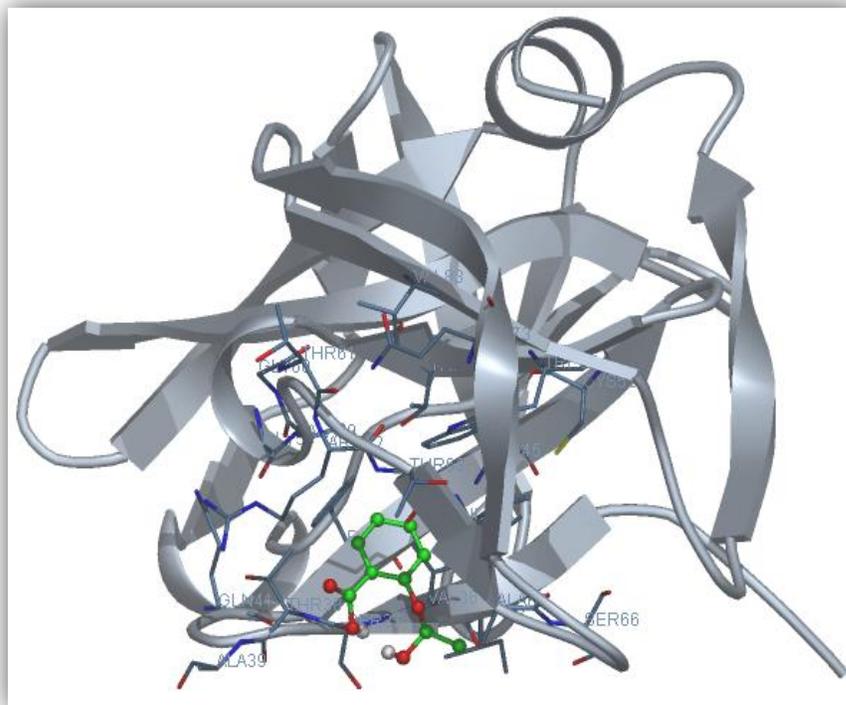


Figura 5.2 Resultado en imagen de análisis de docking entre la proteína NS3y el ácido acetilsalicílico. Realizado en el Molecular Docking Server, <http://www.molecularstation.com/>. Los aminoácidos de posible interacción son: isoleucina 35, valina 36, serina 37, treonina 38, glicina 41, alanina 45, cisteína 52, arginina 62, treonina 63, alanina 65, y serina 66.

Del total de aminoácidos que posiblemente tengan interacción con el ácido acetilsalicílico, ninguno pertenece a la tríada catalítica de la actividad proteasa. El único aminoácido que se acerca es la histidina 57 pero no se menciona en el análisis por docking. Aunque la interacción se da alrededor de este aminoácido, prueba suficiente como para tomarlo como antecedente de un posible efecto de la actividad proteasa.

Para checar si el sistema de amortiguador utilizado en este estudio, proteasa NS3/4A, temperatura, etc. se encontraba en el nivel óptimo para realizar los diferentes experimentos de los objetivos, se obtuvo la constante de Michaelis-Menten. De este experimento se obtuvo la siguiente grafica de dobles recíprocos, con una R cuadrada de 0.9946, lo que indica la linealidad del experimento y la confianza en que predice el comportamiento de los datos manejados en este experimento.

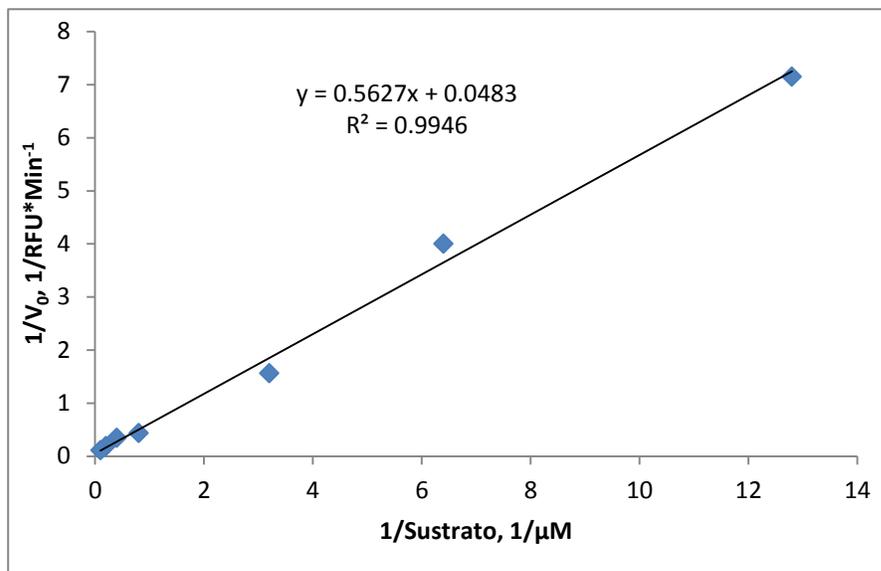


Figura 5.3 Grafica correspondiente a los datos obtenidos de la cinética para calcular la constante de Michaelis-Menten a través del método grafico de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk.

La constante de Michaelis-Menten obtenida es de $9.47 \pm 2.5 \mu\text{M}$, la cual se encuentra en el rango reportado por otros autores en la literatura (tabla 5.1).

Km(μM)	Kcat(Min ⁻¹)	Kcat/Km(M ⁻¹ s ⁻¹)
9.47 ± 2.5		
3.2 ⁸⁸	2.7	14127.3
10.0 ± 3.0 ⁸⁹	2.55	255
2.1 ± 0.2 ⁹⁰	46 ± 3	3.7 X10 ⁵

Tabla 5.1 Diferentes parámetros cinéticos reportados para la proteína NS3/4A, específicamente para la actividad proteasa, el primer parámetro fue el obtenido en este trabajo. Las cinéticas fueron de 30 minutos en todos los casos.

Al determinar que los parámetros cinéticos de nuestra enzima, y nuestro sistema de amortiguadores trabajan de manera eficiente, se llevo a cabo el primer experimento para el objetivo número uno. El resultado fue que a concentraciones de 30-500μM de ácido acetilsalicílico, la actividad proteasa de la enzima NS3/4A no se ve afectada, esto se comprueba por el nivel



de actividad de la proteína sin ácido acetilsalicílico (control) y las otras concentraciones de este compuesto. En ningún caso se encontró diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

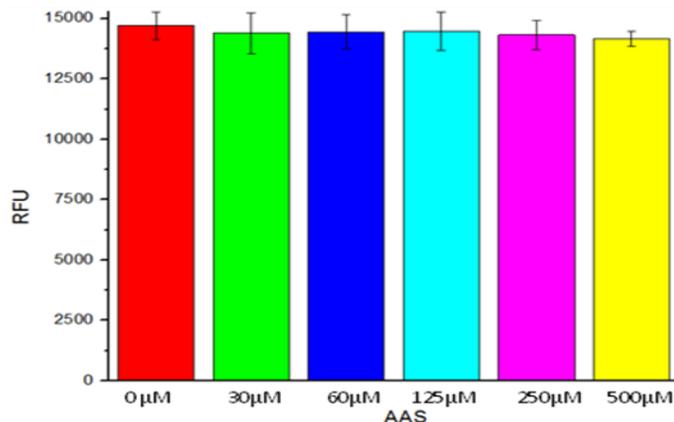


Figura 5.4 Gráfico donde se muestra un comparativo entre la actividad proteasa de la proteína NS3/4A bajo diferentes concentraciones de ácido acetilsalicílico y un control sin el compuesto.

Encontrándose que con la concentraciones menores o iguales a 500μM de AAS no hay efecto en la actividad enzimática. Se decidió aumentar la concentración de AAS usando un rango de concentraciones desde 1mM hasta 16mM. Se obtuvo un comportamiento similar que el encontrado en el experimento anterior: no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las actividades de la proteína NS3/4A comparadas con el control o entre ellas. Esto se observa de manera más directa con los resultados presentados en la Figura 5.5.

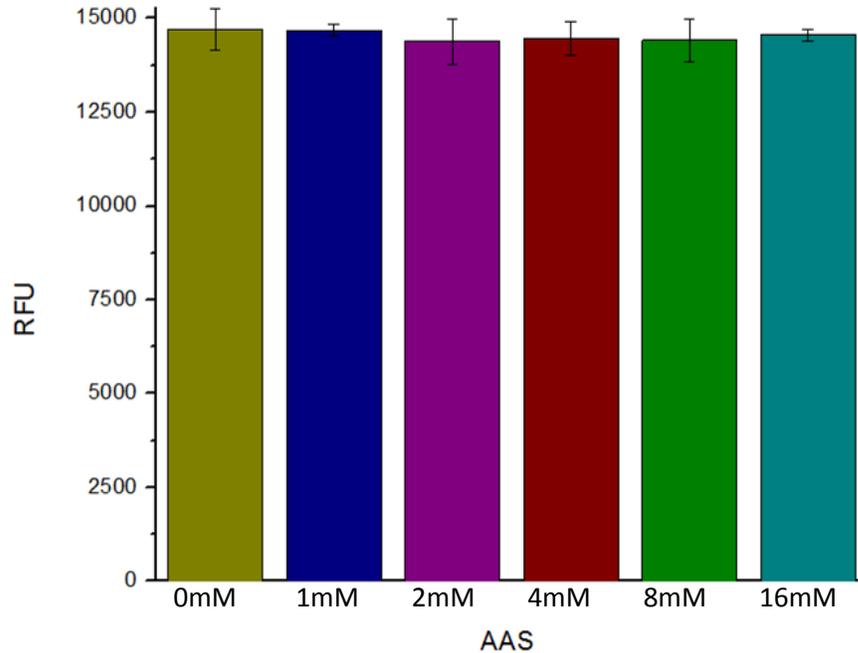


Figura 5.5 Gráfico donde se muestra un comparativo entre la actividad (RFU) proteasa de la proteína NS3/4A expuesta a altas concentraciones de ácido acetilsalicílico. Debe mencionarse que después de 4mM este efecto pierde interés clínico, por los efectos citotóxicos del AAS.

A primera vista, esto indicaría que no existe un efecto en la actividad de la proteína NS3/4A. Con la intención de evitar que el resultado no fuera en realidad un artefacto por la gran cantidad de AAS utilizada, en comparación con el sustrato, o que sea un artefacto porque el tiempo de reacción sea muy corto para medir el efecto de este compuesto sobre la actividad de la enzima, se realizaron dos nuevos experimentos.

En el primer experimento, la variable a modificar fue el tiempo, se tomaron tres concentraciones de ácido acetilsalicílico y un control, se utilizó la temperatura y cantidad de sustrato que se utilizó para el experimento del objetivo uno, solo se duplico el tiempo de reacción a dos horas, observándose que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de la enzima expuesta a diferentes concentraciones de AAS con respecto al control. Como puede observarse en la Figura 5.6, la enzima sigue la misma tendencia de actividad en presencia o ausencia de AAS.

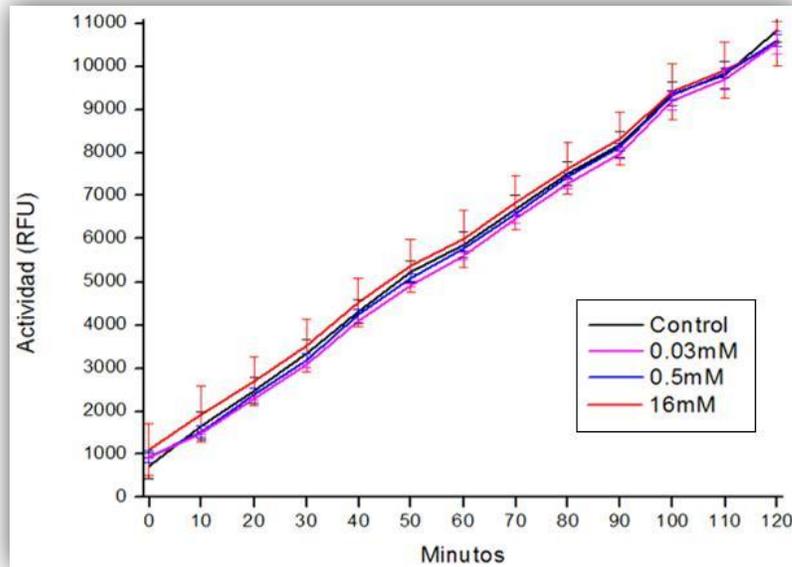


Figura 5.6. Grafica de actividad proteasa con respecto al tiempo de la proteína NS3/4A. Como puede observarse en la gráfica, el comportamiento es similar a cualquier concentración de AAS, y no existe diferencia al menos a las dos horas de reacción. El control es la reacción enzimática sin la adición de AAS.

Para demostrar que el resultado no es un artefacto dado por la gran concentración de AAS en comparación con la cantidad de sustrato, en el siguiente experimento se elige una concentración definida de 2mM de ácido acetilsalicílico y un control, la variable para este experimento fue la concentración de sustrato. Se inició con 1.5 μ M, posteriormente, se igualó la cantidad de sustrato a la constante de Michaelis-Menten, y por último, se duplicó la concentración de sustrato según la constante de Michaelis-Menten calculada anteriormente para nuestro sistema.

Los resultados se observan en la figura 5.7, en donde se demuestra que no hay una diferencia significativa en la actividad (medida en unidades relativas de fluorescencia, RFU en inglés) en nuestra enzima expuesta al AAS y el control, aun variando la concentración de sustrato.

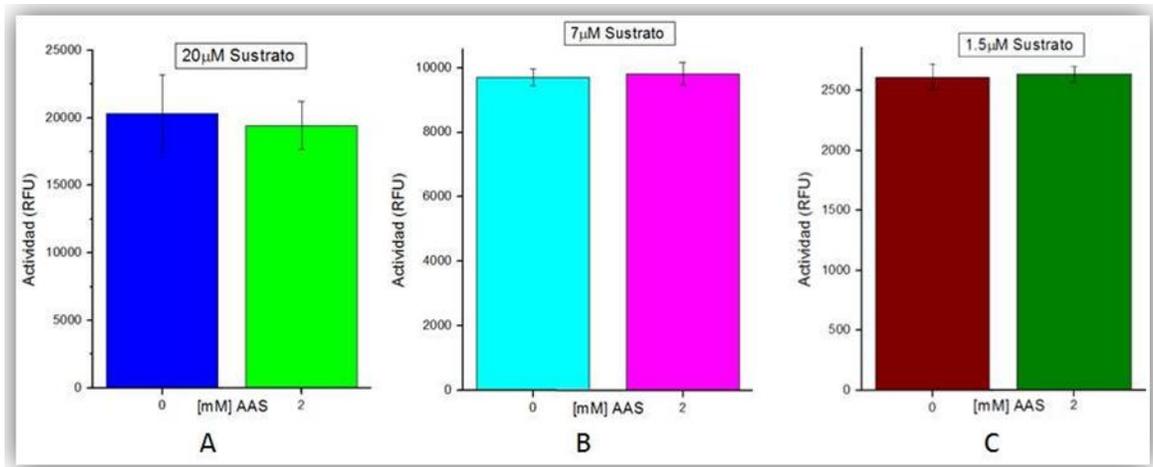


Figura 5.7 Actividad de la proteína NS3/4A al variar la cantidad de sustrato y mantener a 2mM el AAS. A) reacción realizada con 3 veces la constante de Michaelis-Menten en sustrato. B) Reacción realizada con 1 vez la constante de Michaelis-Menten en sustrato. C) Reacción realizada con 3 veces más sustrato que el utilizado en una reacción habitual.

Al obtener los resultados, se observa que no existe una diferencia significativa en la actividad de la proteína NS3/4A bajo ninguna concentración de ácido acetilsalicílico usada en este trabajo, y tampoco hizo diferencia el aumento del tiempo de reacción o de concentración de sustrato. Por lo cual, se anularon los objetivos dos y tres de nuestro trabajo para la actividad proteasa, ya que no se puede definir una concentración de ácido acetilsalicílico que afecte la actividad de la proteasa NS3/4A.

Por tanto, decidimos iniciar el experimento del objetivo número cuatro, que es “evaluar la actividad de la proteasa-helicasa en células Huh7 replicón tratadas con aspirina a una concentración en la que existe disminución en la replicación del virus”. Los detalles de cómo se realizó este experimento se mencionan en el capítulo de métodos.

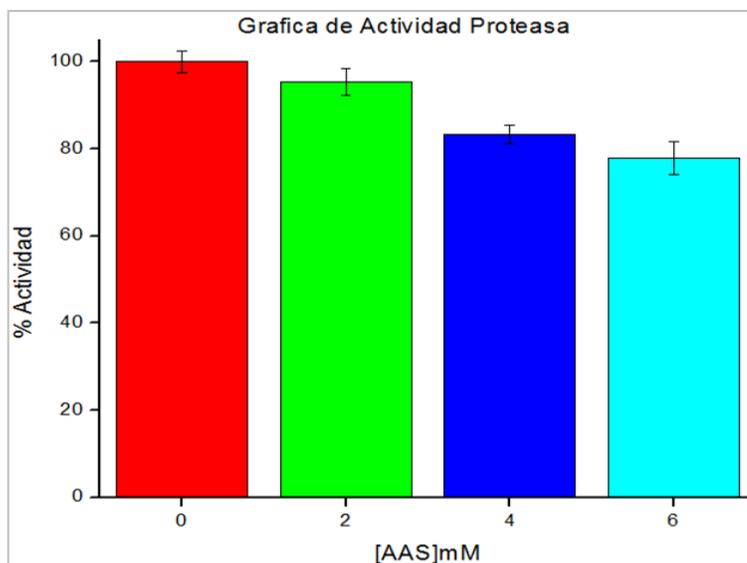


Figura 5.8 Gráfica de porcentajes de actividad proteasa de células Huh-7 tratadas con AAS por 24 horas. Para este experimento sólo se utilizan las membranas de las células.

En el caso del último objetivo para la actividad proteasa, se observa en los resultados una variación del 5% en la actividad para la concentración de 2mM de ácido acetilsalicílico, la cual es estadísticamente significativa comparada con el control y entre las otras dos diferentes concentraciones de AAS (, 4mM y 6mM de ácido acetilsalicílico). Esto nos indica una disminución en la actividad de la proteasa NS3/4A, y una tendencia en la cual a mayor concentración de ácido acetilsalicílico hay una menor actividad en esta proteína, esto, aplicando el tratamiento en células Huh-7 replicón. Debe mencionarse sin embargo, que a concentraciones mayores de 4mM de ácido acetilsalicílico se ha demostrado que existe citotoxicidad por parte de este compuesto⁸⁸.

Resultados actividad helicasa

En el caso de la actividad helicasa, se tuvieron que hacer experimentos preliminares para asegurar una concentración suficiente de proteínas que representara la concentración de 5ng de NS3/4A helicasa. Por tanto, a las membranas obtenidas de las células Huh-7 cultivadas, se les realizó la determinación a



través del método colorimétrico de Bradford y se utilizó como estándar una curva de calibración realizada a diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina. La grafica de la curva estandar se aprecia en la figura 5.9.

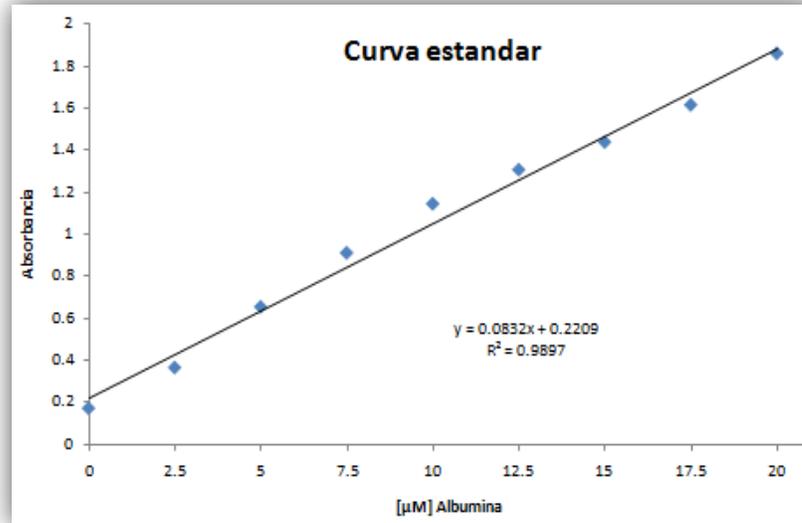


Figura 5.9 Curva de calibración utilizando como estándar albúmina sérica bovina. Esta curva de calibración tiene una R cuadrada de 0.9897 lo que indica que predice el comportamiento lineal del procedimiento.

Como resultado se obtuvo una concentración de 0.35µg/µL de proteína. El siguiente paso fue determinar el título de sitios activos en la muestra, lo cual nos daría un indicio de la cantidad de proteína real que pertenece a la proteína NS3/4A activa en la muestra.

La titulación de sitios activos dio como resultado los datos que se representan en la grafica de la figura 5.10, en donde se puede observar una curva correspondiente a un inhibidor fuerte y lento. Esto significa que se une de manera lenta al sitio activo y que tarda tiempo en dejarlo. Esto se debe a que el complejo enzima-inhibidor inicial sufre una isomerización hacia un complejo más estable. Por tanto, la curva se ajusta a la ecuación cuadrática de Morrison, la que nos divide este tipo de curvas en tres segmentos: segmento A que sirve para titulación de sitios activos y donde hay menor concentración del compuesto inhibidor; segmento B el cual tiene forma de curva o codo y sirve para calcular la constante de inhibición y, el segmento c que es casi paralelo al eje de las x. La ecuación de



Morrison nos da como resultado la constante de inhibición del oligo dT, alrededor de 650nM. Los datos anteriores muestran que son 15 veces más alta que la reportada en la literatura.

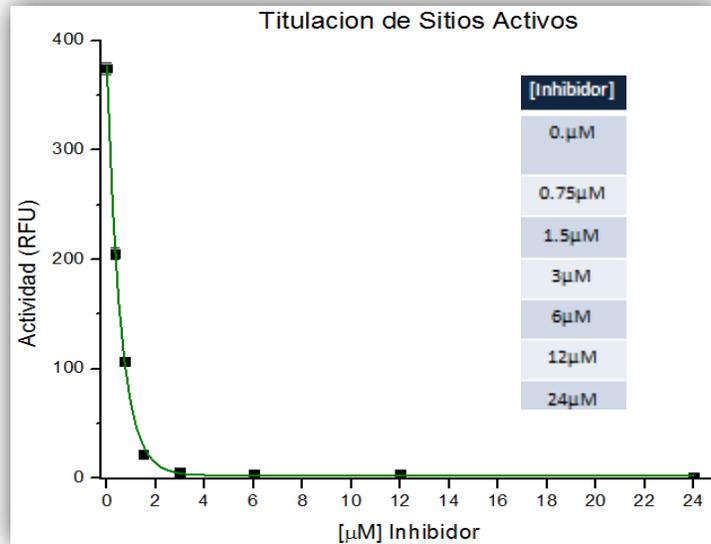


Figura 5.10 Grafica de titulación de sitios activos. En esta gráfica se observa la potente inhibición del oligo dT, que a concentraciones de 750nM disminuye hasta en un 50% la actividad de la helicasa Ns3/4A

Para la titulación de sitios activos, se utiliza, como ya se mencionó, la región A de la curva, esto es porque al ser casi paralela al eje de las “y”, puede asumirse que es lineal y aplicarse de manera directa la ecuación de la línea recta para determinar el número de enzimas activas en el extracto de membranas de células Huh7 replicón. Esto nos dio un resultado de 0.09μg/μL de enzima activa. En la figura 5.11 se observan la gráfica de las primeras dos concentraciones de oligo dT y el control, como se puede observar, se ve un comportamiento lineal con una r cuadra de 0.965.

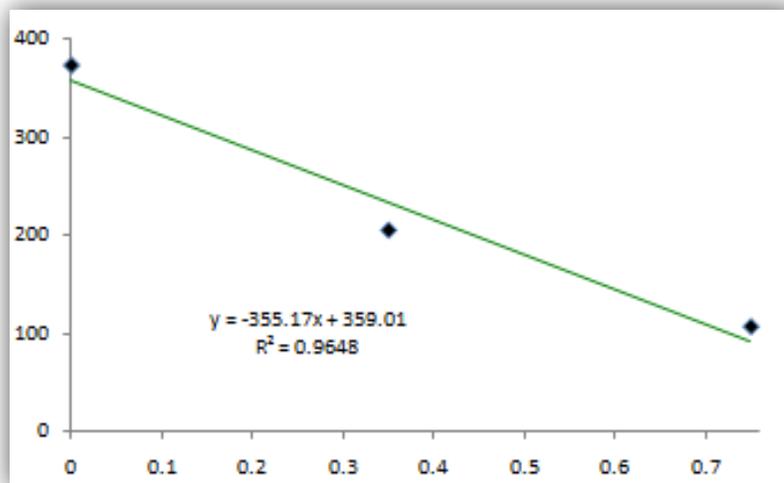


Figura 5. 11 Grafica correspondiente al control y dos concentraciones sucesivas de oligo dT, en donde se observa un comportamiento lineal a bajas concentraciones del inhibidor. Estos puntos corresponden al segmento A, de la curva original.

Obtenida la concentración de enzimas activas del extracto de membranas de células Huh7 replicón, procedimos a realizar el experimento correspondiente al objetivo uno para la actividad helicasa. El propósito de este experimento era encontrar la concentración mínima que afectara la actividad helicasa de la proteína NS3/4A. Se realizó un barrido de concentraciones de AAS, iniciando desde el control de $0\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$, $300\mu\text{M}$. Observándose que no existe diferencia significativa en la actividad del control comparada con las otras concentraciones de AAS (figura 5.12).

Se debe mencionar que se comprobó este resultado aumentado el tiempo de reacción a treinta minutos, observándose que después del minuto quince de la cinética, la señal se mantenía estable para cualquier concentración de AAS. También se aumentó la concentración de ATP, ya que la actividad helicasa de la proteína NS3/4a es dependiente de ATP, obteniéndose un aumento de actividad generalizado para todas las concentraciones de AAS, no existiendo diferencia con el control sin AAS. Véase figura 5.12.

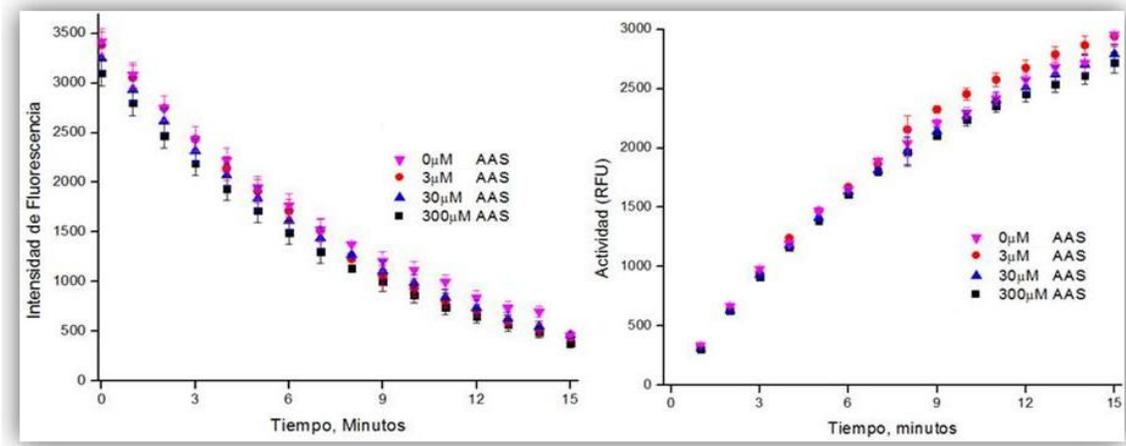


Figura 5.12 Graficas de actividad helicasa bajo tres tratamientos diferentes de AAS. La grafica del lado izquierdo indica el descenso de la señal con respecto al tiempo. En el lado derecho, la grafica indica el aumento de actividad de la helicasa con respecto al tiempo, observándose que no hay diferencias significativas entre el control y las demás concentraciones de AAS.

Al no determinarse una concentración mínima que afecte a la proteína NS3/4A, se procedió a realizar el objetivo cuatro que es el tratamiento de células Huh7 replicón con diferentes concentraciones de AAS por 24 horas. Se obtuvieron los siguientes resultados: comparando la actividad helicasa de cada una de las concentraciones de AAS con respecto al control, todas dieron una diferencia estadísticamente significativa del cinco por ciento. Pero al comparar la actividad de cada una de estas concentraciones entre ellas, no existe tal diferencia; lo que nos indica que a concentraciones mayores de 2mM no existe una diferencia estadísticamente significativa, esto con respecto a las concentraciones de 4 y 6mM; la única diferencia observada es para cualquier concentración de ácido acetilsalicílico comparada con el control. Debe mencionarse que este resultado es interesante porque nos indica que se obtiene el efecto máximo por parte del ácido acetilsalicílico a concentraciones menores a la que está reportada como citotóxica. Los resultados se pueden observar en la figura 5.13.

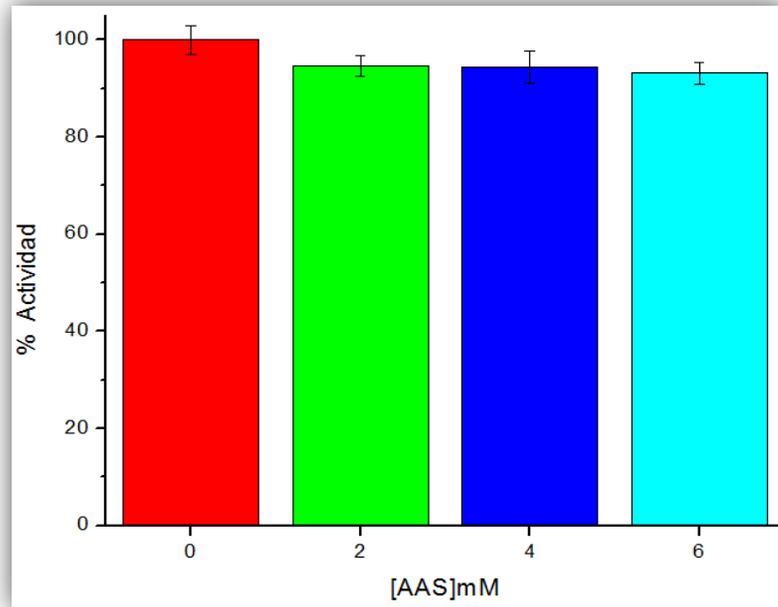


Figura 5.13 Grafica de actividad helicasa del extracto de membranas de células Huh7 replicón bajo tratamiento con ácido acetilsalicílico, en un rango de concentraciones de 0, 2, 4 y 6mM, por 24 horas.



CAPITULO VI. DISCUSION

Actividad proteasa

En nuestro trabajo se obtuvo como resultado preliminar para la actividad proteasa su constante de Michaelis-Menten, esto con la intención de observar la capacidad de nuestro sistema para llevar a cabo la reacción enzimática. Nuestro resultado para la constante de Michaelis-Menten es de $9.47 \pm 2.5 \mu\text{M}$, el cual está acorde con los resultados obtenidos por otros investigadores para esta enzima. En 2005 Xiaohe y colaboradores reportan una K_m de $3.2 \mu\text{M}$. En 2010 Massariol y colaboradores⁹² reportan para esta misma enzima una K_m de $2.1 \pm 0.2 \mu\text{M}$. Lo que nos indica que nuestra enzima se encuentra en un rango aceptable de trabajo ya que la afinidad de la enzima aun se encuentra en el rango de micromolar.

En cuanto a los resultados de la actividad proteasa, es interesante observar que no existe un efecto bajo ninguna concentración utilizada en este trabajo, esto no significa que no exista una concentración definida de AAS que afecte a esta enzima, simplemente que para nuestro interés, cualquier concentración que sea mayor de 4mM es citotóxica⁹³.

Aunque en la predicción por docking, el ácido acetilsalicílico se une a aminoácidos cercanos a la triada catalítica, esto no nos dice con qué especificidad se da la interacción, o cuál es la fuerza de esta interacción, por lo que no necesariamente la interacción de el AAS con la proteína NS3/4A va mostrar un efecto en su actividad. También debe mencionarse que el resultado del docking molecular obtenido de la proteína NS3/4A y el AAS, se ve afectado por el software que se utilizó para hacer el estudio, ya que dependiendo del software y del algoritmo con el cual esté programado, es como dará importancia a las posibles interacciones proteína-ligando⁹⁴.

En el caso de la actividad proteasa en células Huh7 tratadas con ácido acetilsalicílico, se observa una disminución en la actividad proteasa, que se acentúa según aumenta la



concentración de ácido acetilsalicílico, como una relación inversamente proporcional. Debe mencionarse sin embargo, que este resultado no confirma ni descalifica la posibilidad de que el ácido acetilsalicílico esté afectando la actividad de esta proteasa, pero se debe ser crítico al observarlo, por lo siguiente, es posible que el salicilato derivado del AAS sea la especie que realmente esté actuando en contra de la enzima. También es posible que en el proceso de desactivar COX dentro de la célula, se vea afectado el ciclo de vida del virus, lo que se reflejaría en un descenso en el número de virus y, por consiguiente, en el número de proteínas NS3/4A producidas. Además, también debe recordarse que a concentraciones mayores de 4mM de AAS existe citotoxicidad, por lo cual, es posible que en la concentración de 6mM, exista un descenso en la actividad porque las células están muriendo⁸⁶.

Actividad helicasa.

En la determinación de la actividad helicasa, los ensayos preliminares nos arrojan una constante de inhibición de 650nM para el inhibidor Oligo dT. En la literatura se menciona que para ésta enzima en particular y con el inhibidor oligo dT se tiene una constante de inhibición (Ki) de 30nM⁹⁵. En nuestro caso, el aumento es de casi 20 veces, lo que significa que la afinidad por el sustrato es menor, esto se puede explicar por el hecho de que en los ensayos se utiliza una enzima recombinante purificada por cromatografía de afinidad con etiquetas de histidina, lo que permite una concentración alta de la enzima NS3/4A⁹⁶. En nuestro caso, la proteína Ns3/4A con actividad helicasa la obtuvimos de células Huh7 replicón, las cuales fueron lisadas de manera mecánica para obtener esta proteína asociada a membrana. Entonces, para realizar nuestros ensayos requerimos mas proteína en cada uno de ellos, y no todo este contenido proteico pertenecía a la proteína NS3/4A o a proteína activa. Es por esto que nuestro resultado se dispara, aun así, entra en el rango de concentración nanomolar, por lo cual es aceptable. Otra diferencia importante es que en sus ensayos hacen una titulación con cloruro de manganeso, lo que en nuestros ensayos no se realizó.



En cuanto a afectar la actividad helicasa con ácido acetilsalicílico, no se encontró evidencia bajo ninguna de las concentraciones utilizadas en este trabajo en extractos proteicos de células Huh7. Buscando en la literatura se encuentran que en realidad el AAS no afecta el sitio activo de las helicasas sino el sitio donde se degrada el ATP, el sitio con actividad ATP-asa que utiliza la energía para el movimiento de la helicasa. Concentrándonos en este hecho se reporta en la literatura dos efectos diferentes que afectan sitios ATP-asa.

A bajas concentraciones de AAS éste se comporta como un inhibidor no-competitivo, y cuando se encuentra en altas concentraciones, se vuelve un inhibidor competitivo y estequiométrico para el sitio ATP-asa; Yin y colaboradores reportan que con concentraciones de 1mM hasta 20mM de salicilatos uno observa el comportamiento de inhibidor competitivo para diferentes cinasas⁹⁷.

Las concentraciones utilizadas en nuestro experimento para la inhibición de la actividad helicasa fueron de 3 μ M, 30 μ M y 300 μ M de AAS, lo que significa que trabajamos en el rango en donde el AAS se comporta como un inhibidor no-competitivo, lo que explicaría el por qué no existe diferencia entre las diferentes concentraciones. Debe mencionarse que en la literatura no hay datos que reporten el uso de AAS como inhibidor de sitios con actividad ATP-asas a concentraciones menores a 1mM.

En cuanto a los resultados obtenidos para la actividad helicasa de células Huh7 tratadas por 24 horas con ácido acetilsalicílico, se observa un descenso en la actividad del 5% el cual es estadísticamente significativo, para este resultado debe resaltarse que según lo reportado por Frantz y O'Neill en 1995⁹⁸, y O'Neill en 1998⁹⁹; el ácido acetilsalicílico y el salicilato afectan a muchas cinasas al mismo tiempo cuando entran a la célula, por lo cual, sus efectos son muy diversos según el tipo celular al que se le esté administrando el fármaco. Por esto la acción de él ácido acetilsalicílico y los salicilatos es sinérgico, pues no afecta a un sola cinasa o a un solo gen¹⁰⁰. De acuerdo a esto se pueden estar atacando al VHC por dos vías: activando genes que afecten la replicación del



virus y al inhibir la actividad de la helicasa la cual es indispensable para la replicación.



CAPITULO VII. CONCLUSIONES

No hay evidencia experimental que indique una inhibición sobre la actividad Proteasa y Helicasa de la NS3/4A por parte del AAS a las concentraciones y tiempo usados en este trabajo cuando se utiliza las proteínas recombinantes o las obtenidas a través de extractos celulares.

Se demuestra de manera clara que existe un efecto del AAS sobre la células Huh7 replicón, pero se desconoce si se debe a una interacción directa del AAS o sus metabolitos dentro de la célula con la proteína NS3/4A o por activar diferentes vías de señalización.



CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS

Relacionar las actividades obtenidas en células, con la carga viral con el mismo orden de tratamientos.

Aumentar el tiempo de tratamiento de las células, para observar si el efecto sobre la actividad se mantiene por más de 24 horas.

Realizar los experimentos de actividad helicasa con una proteína recombinante purificada pues está reportado la inhibición de la actividad ATPasa por el AAS.



CAPITULO IX. REFERENCIAS

- ¹ Q.-L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, M. Houghton, Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. Science 1989, Vol. 244, 359-362
- ² Michael Houghton, Discovery of the hepatitis C virus. Liver International 2009; 29(s1): 82-88
- ³ D. Lavanchy, The global burden of hepatitis C. Liver International 2009; 29(s1): 74-81
- ⁴ G.M. Lauer, B. D. Walker, Hepatitis C virus infection. N Engl J Med, 2001 Vol. 345, No. 1
- ⁵ C.W. Shepard, L. Finelli, M.J. Alter, Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect Dis 2005; 5: 558-67
- ⁶ J. Berkes, S.J. Cotler, Global Epidemiology of HCV Infection. Current Hepatitis Reports 2005, 4:125-129
- ⁷ M.J. Alter, Epidemiology of hepatitis C virus infection, World J Gastroenterol 2007; 13(17): 2436-2441
- ⁸ J.F. Sánchez-Ávila; E. González; V. Vázquez; S. Suárez; M. Uribe, Geographical distribution of HCV genotypes in Mexico. Annals of Hepatology 2007; 6(3): 156-160
- ⁹ Foster GR. Past, present, and future hepatitis C treatments. Semin Liver Dis 2004;24:97-104
- ¹⁰ Lok, Anna S., Gardiner, David F., Lawitz, Eric, Martorell, Claudia, Everson, Gregory T.AU - Ghalib, Reem Reindollar, Robert Rustgi, Vinod McPhee, Fiona Wind-Rotolo, Megan Persson, Anna Zhu, Kurt Dimitrova, Dessislava I. Eley, Timothy Guo, Tong AU - Grasela, Dennis M. Pasquinelli, Claudio, Preliminary Study of Two Antiviral Agents for Hepatitis C Genotype 1 2012, New England Journal of Medicine January 366(3):216



¹¹ M. Sarasin-Filipowicz, E.J. Oakeley, F.H.T. Duong, V. Christen, L. Terracciano, W. Filipowicz, M.H. Heim, Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. PNAS 2008 vol. 105, no. 19, 7034-7039

¹² N.M. Dixit, J.E. Layden-Almer, T.J. Layden, A.S. Perelson, Modelling how ribavirin improves interferon response rates in hepatitis C virus infection. Nature 2004, Vol 432,922-924

¹³ S. Chevaliez, R. Brillet, E. Lázaro, C. Hézode, J.M. Pawlotsky, Analysis of Ribavirin Mutagenicity in Human Hepatitis C Virus Infection. JOURNAL OF VIROLOGY, 2007,vol 81 N°14, 7732-7741

¹⁴ S. Zeuzem, Heterogeneous Virologic Response Rates to Interferon-Based Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C: Who Responds Less Well?, *Ann Intern Med.* 2004;140:370-381.

¹⁵ P. Simmonds, J. Bukh, C. Combet, G. Deléage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspé, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J. M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, T. Shin-I, L. J. Stuyver, H.J. Ürgen Thiel, S. Viazov, A. J. Weiner, A. Widell, Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes, HEPATOLOGY 2005;42:962-973

¹⁶ N. Antaki, A. Craxi, S. Kamal, R. Moucari, S. Van der Merwe, S. Haffar, A. Gadano, N. Zein, C. Lung-Lai, J.M. Pawlotsky, E. J. Heathcote, G. Dusheik, P. Marcellin, The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report, Liver International (2009)

¹⁷ J.F. Sánchez-Ávila; E. González; V. Vázquez; S. Suárez; M. Uribe1, Geographical distribution of HCV genotypes in Mexico, Annals of Hepatology 2007; 6(3): 156-160

¹⁸ A.M. Rivas-Estilla; P. Cordero-Pérez; K.C. Trujillo-Murillo; J. Ramos-Jiménez;C. Chen-López;3 M.L. Garza-Rodríguez; Á. Ramírez-Gutiérrez;3 L. Muñoz-Espinosa, Genotyping of



hepatitis C virus (HCV) in infected patients from Northeast Mexico, *Annals of Hepatology* 2008; 7(2): 144-147

¹⁹ K.C. Trujillo-Murillo, M.L. Garza-Rodríguez, H.G. Martínez-Rodríguez, H.A. Barrera-Saldaña, F. Bosques-Padilla, J. Ramos-Jimenez, A.M. Rivas-Estilla; Experimental Models for hepatitis c virus (HCV): new opportunities for combating hepatitis c, *Annals of Hepatology* 2004; 3(2): 54-62

²⁰ V. Lohmann, F. Körner, J.O. Koch, U. Herian, L. Theilmann, R. Bartenschlager, Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line, *Science* 1999 Vol. 285

²¹ M. Ikeda, M. Yi, K. Li, S.M. Lemon, Selectable Subgenomic and Genome-Length Dicistronic RNAs Derived from an Infectious Molecular Clone of the HCV-N Strain of Hepatitis C Virus Replicate Efficiently in Cultured Huh7 Cells, *JOURNAL OF VIROLOGY* 2002, Vol. 76, No. 6, 2997-3006

²² N. Horscroft, V. CH Lai, W. Cheney, N. Yao, J. Z Wu., Z. Hong, W. Zhong, Replicon cell culture system as a valuable tool in antiviral drug discovery against hepatitis C virus, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2005, 16:1-12

²³ Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and T. J. Liang, Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*, 2005, 11:791-796

²⁴ Hsu, M., J. Zhang, M. Flint, C. Logvinoff, C. Cheng-Mayer, C. M. Rice, and J. A. McKeating. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. 100:7271-7276

²⁵ Pileri, P., Y. Uematsu, S. Campagnoli, G. Galli, F. Falugi, R. Petracca, A. J. Weiner, M. Houghton, D. Rosa, G. Grandi, and S. Abrignani Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282:938-941.



- ²⁶ Bartosch, B., A. Vitelli, C. Granier, C. Goujon, J. Dubuisson, S. Pascale, E. Scarselli, R. Cortese, A. Nicosia, and F. L. Cosset. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of coreceptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 2003. 278:41624-41630.
- ²⁷ Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz, and C. M. Rice. Claudin-1 is a hepatitis C virus coreceptor required for a late step in entry. *Nature*, 2007 446:801-805.
- ²⁸ Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight, and Q. X. Zhang. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999. 96:12766-12771
- ²⁹ Wunschmann, S., H. M. Muller, C. S. Stipp, M. E. Hemler, and J. T. Stapleton. *In vivo* interaction between hepatitis C virus (HCV) envelope glycoprotein E2 and serum lipoproteins (LPs) results in enhanced cellular binding of both HCV E2 and LPs. *J. Infect. Dis.* 2006. 194:1058-1067.
- ³⁰ Dumont, S., W. Cheng, V. Serebrov, R. K. Beran, I. Tinoco Jr, A. M. Pyle, and C. Bustamante. RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* 2006. 439:105-108
- ³¹ Welbourn, S. and A. Pause. The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2007. 9:63-69.
- ³² Carrere-Kremer, S., C. Montpellier, L. Lorenzo, B. Brulin, L. Cocquerel, S. Belouzard, F. Penin, and J. Dubuisson. 2004. Regulation of hepatitis C virus polyprotein processing by signal peptidase involves structural determinants at the p7 sequence junctions. *J. Biol. Chem.* 2004. 279:41384-41392.
- ³³ Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour, and K. Bienz. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a



candidate viral replication complex. *J. Virol.* 2002 76:5974-5984.

³⁴ Gosert, R., W. Jendrschok, J. M. Berke, V. Brass, H. E. Blum, and D. Moradpour. Characterization of nonstructural protein membrane anchor deletion mutants expressed in the context of the hepatitis C virus polyprotein. *J. Virol.* 2005. 79:7911-7917.

³⁵ Elazar, M., P. Liu, C. M. Rice, and J. S. Glenn. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J. Virol.* 2004. 78:11393-11400.

³⁶ Wolk, B., D. Sansonno, H. G. Krausslich, F. Dammacco, C. M. Rice, H. E. Blum, and D. Moradpour. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J. Virol.* 2000. 74:2293-2304.

³⁷ Elazar, M., K. H. Cheong, P. Liu, H. B. Greenberg, C. M. Rice, and J. S. Glenn. Amphipathic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 2003. 77:6055-6061.

³⁸ Moradpour, D., V. Brass, E. Bieck, P. Friebe, R. Gosert, H. E. Blum, R. Bartenschlager, F. Penin, and V. Lohmann. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 2004. 78:13278-13284.

³⁹ Lindenbach, B. D. and C. M. Rice. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005. 436:933-938

⁴⁰ Moradpour, D., V. Brass, and F. Penin. 2005. Function follows form: the structure of the N-terminal domain of HCV NS5A. *Hepatology* 42:732-735.



- ⁴¹ Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, and C. M. Rice. 2005. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435:374-379.
- ⁴² Piccininni, S., A. Varaklioti, M. Nardelli, B. Dave, K. D. Raney, and J. E. McCarthy. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the nonstructural (NS)3 helicase and the NS4B membrane protein. *J. Biol. Chem.* 2002. 277:45670-45679
- ⁴³ Huang, L., J. Hwang, S. D. Sharma, M. R. Hargittai, Y. Chen, J. J. Arnold, K. D. Raney, and C. E. Cameron. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 2005. 280:36417-36428.
- ⁴⁴ Behrens, S. E., L. Tomei, and R. De Francesco. 1996. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 15:12-22
- ⁴⁵ Goh, P. Y., Y. J. Tan, S. P. Lim, Y. H. Tan, S. G. Lim, F. Fuller-Pace, and W. Hong. 2004. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J. Virol.* 78:5288-5298.
- ⁴⁶ Isken, O., M. Baroth, C. W. Grassmann, S. Weinlich, D. H. Ostareck, A. Ostareck-Lederer, and S. E. Behrens. 2007. Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *RNA* 13:1675-1692.
- ⁴⁷ Mottola, G., G. Cardinali, A. Ceccacci, C. Trozzi, L. Bartholomew, M. R. Torrisi, E. Pedrazzini, S. Bonatti, and G. Migliaccio. 2002. Hepatitis C virus nonstructural proteins are localized in a modified endoplasmic reticulum of cells expressing viral subgenomic replicons. *Virology* 293:31-43.
- ⁴⁸ Lundin, M., H. Lindstrom, C. Gronwall, and M. A. Persson. 2006. Dual topology of the processed hepatitis C virus protein



NS4B is influenced by the NS5A protein. *J. Gen. Virol.* 87:3263-3272.

⁴⁹ Deng, L., M. Nagano-Fujii, M. Tanaka, Y. Nomura-Takigawa, M. Ikeda, N. Kato, K. Sada, and H. Hotta. 2006. NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J. Gen. Virol.* 87:1703-1713

⁵⁰ Hiscott, J., J. Lacoste, and R. Lin. 2006. Recruitment of an interferon molecular signaling complex to the mitochondrial membrane: disruption by hepatitis C virus NS3-4A protease. *Biochem. Pharmacol.* 72:1477-1484.

⁵¹ Ma, H. C., Y. Y. Ku, Y. C. Hsieh, and S. Y. Lo. 2007. Characterization of the cleavage of signal peptide at the C-terminus of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase. *J. Biomed. Sci.* 14:31-41.

⁵² Murray, C. L., C. T. Jones, J. Tassello, and C. M. Rice. 2007. Alanine scanning of the hepatitis C virus core protein reveals numerous residues essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 81:10220-10231

⁵³ Griffin, S. D., L. P. Beales, D. S. Clarke, O. Worsfold, S. D. Evans, J. Jaeger, M. P. Harris, and D. J. Rowlands. 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

⁵⁴ Steinmann, E., F. Penin, S. Kallis, A. H. Patel, R. Bartenschlager, and T. Pietschmann. 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 3:e103.

⁵⁵ Jones, C. T., C. L. Murray, D. K. Eastman, J. Tassello, and C. M. Rice. 2007. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 81:8374-8383.



⁵⁶ Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel, and R. Bartenschlager. 2008. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog.* 4:e1000035.

⁵⁷ Volker Brass, Darius Moradpour and Hubert E. Blum, *Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update*, *International Journal of Medical Sciences*, 2006 3(2):29-34

⁵⁸ Hahm, B., D. S. Han, S. H. Back, O. K. Song, M. J. Cho, C. J. Kim, K. Shimotohno, and S. K. Jang. 1995. NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. *J. Virol.* 69:2534-2539.

⁵⁹ Gu, B., C. M. Pruss, A. T. Gates, and S. S. Khandekar. 2005. The RNA-unwinding activity of hepatitis C virus non-structural protein 3 (NS3) is positively modulated by its protease domain. *Protein Pept. Lett.* 12:315-321.

⁶⁰ Frick, D. N., R. S. Rypma, A. M. Lam, and B. Gu. 2004. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. *J. Biol. Chem.* 279:1269-1280

⁶¹ Dahl, G., A. Sandstrom, E. Akerblom, and U. H. Danielson. 2007. Effects on protease inhibition by modifying of helicase residues in hepatitis C virus nonstructural protein 3. *FEBS J.* 274:5979-5986.

⁶² Martin, F., N. Dimasi, C. Volpari, C. Perrera, S. Di Marco, M. Brunetti, C. Steinkuhler, R. De Francesco, and M. Sollazzo. 1998. Design of selective eglin inhibitors of HCV NS3 proteinase. *Biochemistry* 37:11459-11468.

⁶³ Sikora, B. T., Y. Chen, C. F. Lichti, M. K. Harrison, T. A. Jennings, Y. Tang, A. J. Tackett, J. B. Jordan, J. Sakon, C. E. Cameron, and K. D. Raney. 2008. Hepatitis C Virus NS3 helicase forms oligomeric structures that exhibit optimal DNA unwinding activity *in vitro*. *J. Biol. Chem.*



⁶⁴ Levin, M. K. and S. S. Patel. 1999. The helicase from hepatitis C virus is active as an oligomer. *J. Biol. Chem.* 274:31839-31846.

⁶⁵ Borowski, P., M. Heiland, K. Oehlmann, B. Becker, L. Kornetzky, H. Feucht, and R. Laufs. 1996. Non-structural protein 3 of hepatitis C virus inhibits phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 237:611-618.

⁶⁶ Borowski, P., R. Kuhl, R. Laufs, J. Schulze zur Wiesch, and M. Heiland. 1999. Identification and characterization of a histone binding site of the non-structural protein 3 of hepatitis C virus. *J. Clin. Virol.* 13:61-69.

⁶⁷ Ishido, S. and H. Hotta. 1998. Complex formation of the nonstructural protein 3 of hepatitis C virus with the p53 tumor suppressor. *FEBS Lett.* 438:258-262.

⁶⁸ Hidajat, R; M Nagano-Fuji; L Deng; M Tanaka; Y Takigawa, S Kitasawa; y H Hotta. Hepatitis C virus NS3 protein interacts with ELK delta y ELK alfa member of a novel protein family involven in intracelular transport secretory pathways. 2005 *J. Gen. Virol.* 86:2197-2208

⁶⁹ Love, R. A., H. E. Parge, J. A. Wickersham, Z. Hostomsky, N. Habuka, E. W. Moomaw, T. Adachi, and Z. Hostomska. 1996. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 87:331-342.

⁷⁰ Steinkuhler, C., A. Urbani, L. Tomei, G. Biasiol, M. Sardana, E. Bianchi, A. Pessi, and R. De Francesco. 1996. Activity of purified hepatitis C virus protease NS3 on peptide substrates. *J. Virol.* 70:6694-6700

⁷¹ Zhang, R., J. Durkin, W. T. Windsor, C. McNemar, L. Ramanathan, and H. V. Le. 1997. Probing the substrate specificity of hepatitis C virus NS3 serine protease by using synthetic peptides. *J. Virol.* 71:6208-6213



⁷² Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, J. Mous, and H. Jacobsen. 1994. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* 68:5045-5055

⁷³ Koch, J. O. and R. Bartenschlager. 1999. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J. Virol.* 73:7138-7146.

⁷⁴ Kou, Y. H., S. M. Chou, Y. M. Wang, Y. T. Chang, S. Y. Huang, M. Y. Jung, Y. H. Huang, M. R. Chen, M. F. Chang, and S. C. Chang. 2006. Hepatitis C virus NS4A inhibits cap-dependent and the viral IRES-mediated translation through interacting with eukaryotic elongation factor 1A. *J. Biomed. Sci.* 13:861-874.

⁷⁵ Michael A. Joyce¹, Kathie-Anne Walters, Sue-Ellen Lamb, Mathew M. Yeh, Lin-Fu Zhu, Norman Kneteman, Jason S. Doyle, Michael G. Katze, D. Lorne Tyrrell; HCV Induces Oxidative and ER Stress, and Sensitizes Infected Cells to Apoptosis in SCID/Alb-uPA Mice

⁷⁶ Lamarre, D., P. C. Anderson, M. Bailey, P. Beaulieu, G. Bolger, P. Bonneau, M. Bos, D. R. Cameron, M. Cartier, M. G. Cordingley, A. M. Faucher, N. Goudreau, S. H. Kawai, G. Kukulj, L. Lagace, S. R. LaPlante, H. Narjes, M. A. Poupard, J. Rancourt, R. E. Sentjens, R. St George, B. Simoneau, G. Steinmann, D. Thibeault, Y. S. Tsantrizos, S. M. Weldon, C. L. Yong, and M. Llinas-Brunet. 2003. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 426:186-189

⁷⁷ Lin, C., J. A. Thomson, and C. M. Rice. 1995. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* 69:4373-4380.

⁷⁸ Shimizu, Y., K. Yamaji, Y. Masuho, T. Yokota, H. Inoue, K. Sudo, S. Satoh, and K. Shimotohno. 1996. Identification of the sequence on NS4A required for enhanced cleavage of the NS5A/5B site by hepatitis C virus NS3 protease. *J. Virol.* 70:127-132.



- ⁷⁹ Li, X. D., L. Sun, R. B. Seth, G. Pineda, and Z. J. Chen. 2005. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:17717-17722
- ⁸⁰ Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale Jr, and S. M. Lemon. 2005. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A proteasemediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:2992-2997.
- ⁸¹ Cheng, G., J. Zhong, and F. V. Chisari. 2006. Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:8499-8504.
- ⁸² Kasprzak, A., J. Seidel, W. Biczysko, J. Wysocki, R. Spachacz, and M. Zabel. 2005. Intracellular localization of NS3 and C proteins in chronic hepatitis C. *Liver Int.* 25:896-903.
- ⁸³ Lebon, F. and M. Ledecq. 2000. Approaches to the design of effective HIV-1 protease inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 7:455-477.
- ⁸⁴ Bannwarth, L. and M. Reboud-Ravaux. 2007. An alternative strategy for inhibiting multidrug-resistant mutants of the dimeric HIV-1 protease by targeting the subunit interface. *Biochem. Soc. Trans.* 35:551-554.
- ⁸⁵ Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 2000. Hepatitis C virus encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication *in vivo*. *J. Virol.* 74:2046-2051
- ⁸⁶ Heinrich D, Maier KP; Schweiz Med Wochenschr. Treatment of chronic virus hepatitis with acetylsalicylic acid; 1995 Apr 15;125(15):755-7.



⁸⁷ G. E. Hannigan, B. R. Williams; Signal transduction by interferon-alpha through arachidonic acid metabolism; Science, Vol 251, Issue 4990, 204-207

⁸⁸ CHING-LEN LIAO, YI-LING LIN, BI-CHING WU, CHANG-HUEI TSAO, MEI-CHUAN WANG, CHIU-I LIU, YUE-LING HUANG, JUI-HUI CHEN, JIA-PEY WANG, AND LI-KUANG CHEN; Salicylates Inhibit Flavivirus Replication Independently of Blocking Nuclear Factor Kappa B Activation; JOURNAL OF VIROLOGY, SEPT. 2001, P. 7828-7839

⁸⁹ Karina Trujillo-Murillo, Ana Rosa Rincón-Sánchez, Herminia Martínez-Rodríguez, Francisco Bosques-Padilla, Javier Ramos-Jiménez, Hugo A. Barrera-Saldaña, Marcos Rojkind, and Ana María Rivas-Estilla; Acetylsalicylic Acid Inhibits Hepatitis C Virus RNA and Protein Expression Through Cyclooxygenase 2 Signaling Pathways;; HEPATOLOGY 2008; 47:1462-1472.

⁹⁰ David N. Frick, Olya Ginzburg, Angela M. I. Lam; A Method to Simultaneously Monitor Hepatitis C Virus NS3 Helicase and Protease Activities, *Methods Mol Biol.* 2010 ; 587: 223-233

⁹¹ Xiaohu Tong, Ling Sheng, Xiaofen Zhong, Yi Tang, Junge Lu, Zhenjun Diwu and Anita Hong, Highly Sensitivity FRET Substrate for Assay of HCV Protease, Understanding Biology Using Peptides, American Peptide Society, 2005

⁹² Marie-Josée Massariol, Songping Zhao, Martin Marquis, Diane Thibeault, Peter W. White; Protease and helicase activities of hepatitis C virus genotype 4, 5, and 6 NS3-NS4A proteins; Biochemical and Biophysical Research Communications 391 (2010) 692-697

⁹³ Karina Trujillo-Murillo, Ana Rosa Rincón-Sánchez, Herminia Martínez-Rodríguez, Francisco Bosques-Padilla, Javier Ramos-Jiménez, Hugo A. Barrera-Saldaña, Marcos Rojkind, Ana María Rivas-Estilla; Acetylsalicylic Acid Inhibits Hepatitis C Virus RNA and Protein Expression Through Cyclooxygenase 2 Signaling Pathways; HEPATOLOGY, Vol. 47, No. 5, 2008



- ⁹⁴ Sheng-You Huang, Xiaoqin Zou, Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking, *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11
- ⁹⁵ David N. Frick*, Olya Ginzburg, and Angela M. I. Lam; A Method to Simultaneously Monitor Hepatitis C Virus NS3 Helicase and Protease Activities; *Methods Mol Biol.* 2010 ; 587: 223-233
- ⁹⁶ Agnieszka Gozdek,¹ Igor Zhukov,^{1,2} Agnieszka Polkowska,¹ Jaroslaw Poznanski, Anna Stankiewicz-Drogon,¹ Jerzy M. Pawlowicz,¹ Wlodzimierz Zagoński-Ostoja, Peter Borowski,³ and Anna M. Boguszewska-Chachulska; NS3 Peptide, a Novel Potent Hepatitis C Virus NS3 Helicase Inhibitor: Its Mechanism of Action and Antiviral Activity in the Replicon System; *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Feb. 2008, p. 393-401
- ⁹⁷ Yin, M.-J., Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. (1998), The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature*, 396, 77-80.
- ⁹⁸ Frantz, B. and O'Neill, E.A. (1995) The effect of sodium salicylate and aspirin on NF- κ B. *Science*, 270, 2017-2019
- ⁹⁹ O'Neill, E.A. (1998) A new target for aspirin. *Nature*, 396, 15-17.
- ¹⁰⁰ Deng, W.-G., Ruan, K.-H., Du, M. et al. (2001) Aspirin and salicylate bind to immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) and inhibit its ATPase activity in human fibroblasts. *The FASEB Journal*, 15, 2463-247.



ANEXOS

Cultivo celular de Huh-7 parental y replicón

1. Retirar el medio de cultivo de la botella
2. Lavar la botella de 75cm² con 5mL de PBS estéril 1X
3. Retirar el PBS
4. Añadir 2mL de tripsina
5. Incubar a 37°C por 5 minutos
6. Agregar 2mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina
7. Recuperar con una pipeta graduada las células tripsinizadas
8. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 min
9. Retirar el medio con tripsina
10. Resuspender el botón en 3-4 mL de medio de cultivo
11. Tomar 250µL de células en solución y agregarlas en una botella de 75cm² que contenga 9 mL de medio (10% de suero, 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina)DMEM
12. Mezclar con cuidado para homogenizar
13. Incubar a 37°C/5% de CO₂
14. Almacenar hasta obtener 90% de confluencia

Observaciones: el método anterior está diseñado para las células Huh7 parentales; para las células replicón, el medio de cultivo debe contener 5µL de geneticina (Stock de 100mg/mL) por cada mL de medio.



Descongelamiento de células Huh-7.

1. Dejar atemperar el vial a temperatura ambiente (aunque es mejor introducirlo en un vaso de precipitado con agua a 37°C)
2. Incubar el medio ADMEM a 37°C en baño maría; tanto el criovial como la botella de medio de cultivo deben limpiarse con etanol al 70% antes de permitir su entrada en la campana de seguridad
3. En una botella de 25cm² se depositan 5mL de medio de cultivo ADMEM suplementado con SBF (suero fetal bovino). La alícuota completa del criovial se deposita suavemente, se homogeniza con movimientos circulares suaves.
4. Incubar la botella a 37°C/5% de CO₂.

Observaciones: el tapón de la botella no se cierra por completo, se le deja algo de juego para que exista un mayor intercambio gaseoso; las células después de ser descongeladas se encuentran muy sensibles por lo que se recomienda trabajar lo menos brusco posible para evitar dañarlas. Si las células son de Huh-7 replicón, el medio debe incluir 5µL de geneticina (stock 100mg/mL) por cada mL de medio de cultivo.



Protocolo para preparar membranas que contienen la proteína NS3/4A.

1. Crecer células Huh-7 hasta obtener 1×10^7 - 10^8 células en la botellas, o hasta un 90% de confluencia. Lavar las células con PBS-salino. Despegar las células por raspado. Recolectar las células por centrifugación 900 g por 10 minutos a 4°C.
2. Eliminar el sobrenadante. Re-suspender el pellet de células con 1 mL de buffer hipotónico (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10mM NaCl). Incubar el pellet por 20 minutos en hielo. Rompa el pellet con un homogenizador Dounce.
3. Centrifugar el homogénados a 900 g por 5 minutos a 4°C, esto es para remover los núcleos que se depositaran en el fondo formando un pellet.
4. Recolecte el sobrenadante y colóquelo en otro tubo, este tubo contiene las fracciones de membrana con la proteína NS3/4A. Posteriormente, centrifugue a 15000 g por 20 minutos a 4°C.
5. Descarte el sobrenadante y el pellet se resuspende en 100-500 μ L de buffer de almacenamiento (buffer hipotónico con 15% de glicerol).
6. Se almacena a -80°C para su uso posterior, se pueden almacenar por más de tres meses.



Protocolo de ensayo de inhibición

1. Colocar 1 μ L (5ng/ μ L) de la proteína NS3/4A en un tubo eppendorf de 200 μ L.
2. Agregar la solución determinada de ácido acetilsalicílico y completar con agua hasta 50 μ L.
3. Mezclar suavemente por pipeteo y dejar incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Añadir 50 μ L (1 μ M sustrato) de solución sustrato, mezclar suavemente por pipeteo.
5. Leer en el fluorómetro a longitudes de onda de 490nm de excitación, 520 de emisión.

Preparación de buffer de ensayo.

Por cada mililitro de solución 2X Assay Buffer, se deben agregar 60 microlitros de DTT 1mM.

Preparación de solución sustrato.

Para preparar la solución sustrato se sigue la regla 1:50, en donde por cada microlitro de solución sustrato se agregan 49 de buffer de ensayo. En nuestro caso agregamos el 2X Assay Buffer adicionado con el DTT, a la solución.

Preparación de proteína NS3/4A.

El Stock de proteína NS3/4A tiene una concentración de 200ng/ μ L. Por lo cual se tomo 1 μ L de Stock y se diluye en 39 μ L de agua MiliQ, quedando una solución 1:40, lo que resulta en la concentración de 5ng/ μ L.



Preparación del ácido acetilsalicílico.

El stock de ácido acetilsalicílico tiene una concentración de 19.4mM. por lo cual, debe ser diluido a la concentración deseada con agua MiliQ. Antes de hacer cualquier dilución, se debe calentar a 37°C el Stock de ácido acetilsalicílico y mantenerlo en agitación por lo menos 5 minutos para deshacer los cristales formados por el congelamiento a -20°C.