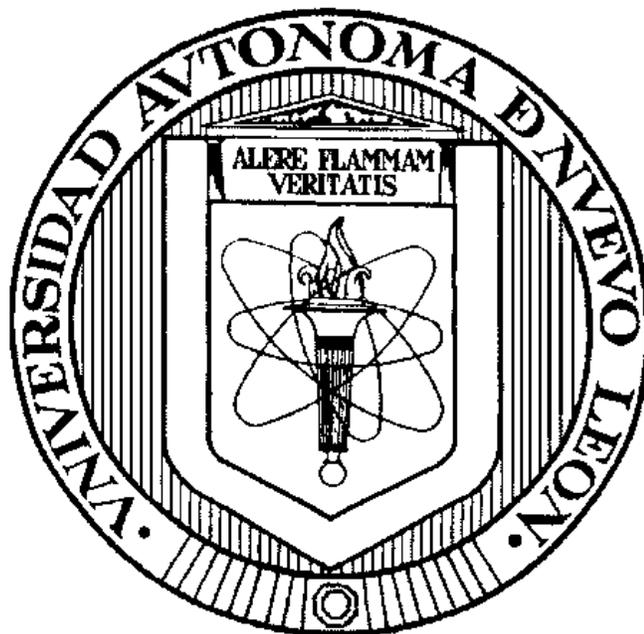


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)
EN LA REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL
VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)**

Por

M.C. JOSE ANGEL MERINO MASCORRO

**Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS
con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

2014

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, Nuevo León, México y en el Instituto Lady Davis en el Hospital General Judío-Universidad de McGill, Montreal, Quebec, Canadá, en colaboración con el Dr. Kostas Pantopoulos. Fue dirigido por la Dra. Ana María Rivas Estilla y supervisada por la Comisión de tesis conformada por la Dra. Ana Rosa Rincón Sánchez, la Dra. Rocío Ortiz López, la Dra. Linda Elsa Muñoz Espinoza, así como por el Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña.

**“ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA
(SOD) EN LA REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL
VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)”**

Aprobación de la tesis:



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



DR. C. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Comisión de Tesis



DRA. C. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA
Comisión de Tesis



DRA. C. ANA ROSA RINCÓN SÁNCHEZ
Comisión de Tesis



DRA. C. ROCIO ORTIZ LÓPEZ
Comisión de Tesis



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

DEDICATORIA

“A mis padres, Irma Alicia Mascorro Elizondo y José Ángel Merino Arellano, por su incondicional apoyo, su cariño y sus consejos. Esta jornada nunca habría sido la misma sin sus enseñanzas y su compañía”

¿Quién soy yo?

Soy las manos de mi abuelo...soy las lágrimas de mi Madre...soy la fuerza de mi Padre...soy todas las bromas de mis hermanos...soy el amor de quien me ha amado y la disciplina de mis maestros. Soy la inspiración de muchos para seguir adelante y soy la gente que aplaudió mis éxitos...soy los consejos de cien hombres...no soy solo yo, soy la suma de todos, el orgulloso resultado del trabajo de otros, de todos aquellos que han tocado mi vida de tantas maneras.

Ahora, llegó el momento...es tiempo de dar.

Who am I?

I am the hands of my grandpa... I am the tears of my Mother...the strength of Father...the jokes of all my brothers...I'm the entire love of my girlfriends and the ruthless discipline of my teachers. I'm the inspiration of many to move onwards and the crowd that applauded my success...I'm the advice of a hundred men...I'm not just me, I'm the sum of everything...The proud result of other's work, People who touched our life in many ways...now it's time to give back

Share yourself.

Buchanan's

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la maravilla de vivir.

A CONACYT por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ana María, por haberme impulsado para lograr mis objetivos, gracias por todos sus consejos y su paciencia, ha sido una gran experiencia el trabajar todo este tiempo bajo su guía.

Al Dr. Kostas Pantopoulos, por recibirme en su laboratorio y permitir mi desarrollo profesional, aprendí muchas cosas estando allá y cambió positivamente mi percepción, gracias por ser parte de tan grandiosa experiencia.

A la Dra. Rocío Ortiz, Dra. Ana Rosa Rincón, Dra. Linda Muñoz y Dr. Hugo Barrera.

A la Dra. Claudia Charles y la MC. Sonia Lozano por su colaboración en el proyecto.

A mis compañeros y amigos del LDI, Carine Fillebeen, quien me enseñó tantas cosas de la ciencia y de la vida, sin su enseñanza no sería la persona que soy ahora, me siento más seguro y mas confiado por todos sus consejos, a John Wagner, su ejemplo siempre estará presente en mi manera de trabajar, es bueno el esfuerzo pero todo es mas sencillo si se trabaja bien desde un comienzo, a mi gran amigo Kostas Gouvatsos, un gran investigador pero una mejor persona, gracias por enseñarme y redirigirme, que la vida también es viajar y tomar fotografías, no todo es el laboratorio, a Nicole y Tricia, siempre recordaré nuestras aventuras dentro y fuera del instituto, no me hubiera integrado a esa vida lejos de casa sin ustedes, a Sasha, siempre alegre y hablando de comida, Betsy y Tim, fue muy interesante conocer a la juventud de una cultura diferente, a Marco, que me mostró que el camino no acaba aquí y que hay que trabajar más para llegar a la meta, a Ranjit, mi “compañero del crimen”, nos tocó ser extranjeros al mismo tiempo, adaptarnos, equivocarnos y ayudarnos el uno al otro, hubiera sido más difícil enfrentarme a esa realidad si hubiera estado solo. Por hacerme sentir como en casa, por ayudarme y ser parte de mi formación como investigador, por tantas enseñanzas, la mejor

experiencia de trabajo que he tenido en mi vida, siempre pensé que sería genial conocer gente de tantas partes del mundo, pero definitivamente la realidad supero a la expectativa, por hacer posible uno de mis más grandes retos, siempre me acordaré de ustedes, los extraño.

Marcel Brochu, ami, frère, coloc, personne plus convivial et plus sociable, certainement c'était le destin, je cherchais un endroit pour passer une longue année et fini de trouver une maison où le temps n'était pas important, je vous remercie beaucoup pour tous vos aider.

A todo el personal docente y administrativo del departamento de bioquímica, Juany, Normita, Ariadna, Irasema, Dani y Lic. Mario, por su ayuda.

A Marcela Cinta por su amistad tan refrescante.

A mis compañeros del Laboratorio de Infectología Molecular, la convivencia no ha sido fácil pero sin duda me ha dejado muchas enseñanzas.

A todos mis amigos de posgrado y los que conocí en este periodo de la vida: Kame, Alex, Mariel, Guillermo, Elda, Marsela, Paola, Yadira, Ramsés, Maribel, Mayela, Tanya, Eduardo, Vero, Blanca, Paulina, Owen y a los que me falten.

A mis amigos de la licenciatura, que se han vuelto otra familia: Patricia, Carmen, Rubí, Xavier y Martin, esto también es para ustedes.

A Mario y Adriana, ha sido un gusto poder conocerlos y pasar tantas cosas juntos, nos hemos divertido mucho, el placer ha sido mío, gracias por aguantar y ayudar a un tipo como yo y cito a Mario refiriéndose a mi ..."eres un desgraciado".

A Daniel, has sido un gran apoyo, siempre honesto, siempre con la mejor cara, hemos pasado días buenos, días malos y días muy malos, pero aquí seguimos, has sido un personaje fundamental en esta historia llamada doctorado, creo que hemos crecido mucho profesionalmente, gracias por tu ayuda en todo momento. Trabajar a tu lado ha sido algo muy sencillo, el laboratorio de "infecto" es un lugar aburrido para trabajar, nunca nadie dijo, sobre todo en estos dos últimos años. Se que nos quedan muchas más aventuras por vivir.

Alejandro y Benjamín, desde dondequiera que estén, sigo con este compromiso, de alguna manera se que debo continuar con tantas cosas que se

que ustedes harían, ya que conservo su influencia y sus consejos, lo menos que puedo hacer es vivir.

A Perla y Ángel “Toro”, desde la distancia siempre me han apoyado.

A todos mis familiares, mis abuelos, tías, tíos, primas y primos, estoy muy feliz de ser parte de esta gran familia, gracias por su tiempo, bromas y apoyo.

A mi hermana y su familia, gracias por estar al pendiente de mi, siempre me dan ánimos para seguir adelante, estoy feliz de que estén a mi lado, Angélica, David, Nicolás y Nicol, a pesar de todo lo que nos toca vivir, somos una familia y soy muy feliz de ser Tío, los quiero.

A mi Papá, siempre serás todo un personaje, sabes que lo poco o mucho que hago no es solo para mí, y no significaría nada, si no es por que a ti también te interesa, mi camino es tu camino, y me agrada saber que siempre estás al pendiente de mi, eso siempre me ha motivado a continuar sin preocupaciones, y al final de cuentas cada meta cumplida es solo un paso más para los dos, se que estamos “lejos”, pero la distancia no tiene nada que ver en estas cosas, a donde quiera que voy te tengo presente, te quiero mucho.

A mi Mamá, por su apoyo incondicional, gracias por ayudarme siempre en todo, estoy seguro que a veces soy muy necio, pero siempre me has ayudado a conseguir todo lo que quiero, nuevamente te digo que todo esto es gracias a ti, un reto más que hemos logrado, ya veremos que es lo que sigue, espero podamos compartirlo y seguir adelante como lo hemos hecho hasta ahora, hemos acabado otra etapa de la vida, muchas gracias por todo, te quiero mucho “Ma”.

A todo aquel que ha participado en esta etapa de mi vida, ha sido todo un placer.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

RESUMEN

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1	Epidemiología por infección con VHC	18
1.1.1	Epidemiología Mundial	18
1.1.2	Epidemiología en México	19
1.1.3	Transmisión	20
1.2	Manifestaciones clínicas	20
1.2.1	Hepatitis aguda	21
1.2.2	Hepatitis C crónica	22
1.2.3	Historia Natural	24
1.2.4	Cirrosis y descompensación hepática	25
1.2.5	Progresión de la enfermedad	26
1.3	Terapia actual	28
1.4	Virología molecular del VHC	32
1.4.1	Taxonomía y genotipos	34
1.4.2	Estructura y organización genómica	35
1.4.3	Ciclo viral	37
1.5	Modelos de estudio	40
1.6	VHC y estrés oxidativo	44
1.6.1	Proteínas virales asociadas con estrés oxidativo	46

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1	Ácido acetil salicílico (AAS) y VHC	48
2.2	Inhibición de la replicación y expresión génica del VHC inducido por AAS	49
2.3	Participación del estrés oxidativo	52

2.4	Superóxido dismutasa (SOD) y VHC	56
-----	--	----

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

.....	59
-------	----

CAPÍTULO IV. OBJETIVOS

4.1	Objetivo general	60
4.2	Objetivos específicos	60
4.3	Estrategia general	61

CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1	Cultivo celular	63
5.2	Clonación del plásmido JFH1	64
5.3	Producción de partículas virales del VHC	64
5.4	Extracción de RNA	66
5.5	Retrotranscripción	66
5.6	PCR cuantitativa	66
5.7	Western blot	68
5.8	Tratamiento con AAS	69
5.9	Bloqueo de la expresión de la SOD1 utilizando la tecnología del RNA de interferencia	69
5.10	Clonación del gen SOD1	70
5.11	Ensayos de transfección transitoria	70
5.12	Análisis estadístico	71

CAPÍTULO VI. RESULTADOS

6.1	Implementación del sistema de infección y cultivo celular para la producción de partículas virales infecciosas del VHC en células Huh7.5.1	72
6.1.1	Clonación y caracterización del plásmido pJFH1	72
6.1.2	Transcripción <i>in vitro</i> del pJFH1	74

6.1.3	Transfección del RNA JFH1	76
6.1.4	Ensayos de infección con partículas del VHC JFH1	77
6.2	Evaluación de los niveles de expresión de SOD en células de hepatoma humano en presencia y ausencia de partículas infecciosas del VHC y un efector positivo de la enzima	79
6.2.1	Estandarización de oligos y qPCR para evaluar los sistemas antioxidantes	79
6.2.2	Expresión de SOD (proteína) en células infectadas con el VHC JFH1	80
6.2.3	Expresión (mRNA) de los sistemas antioxidantes en células infectadas con VHC JFH1	81
6.2.4	Expresión del VHC e células tratadas con AAS	83
6.3	Silenciamiento (knock-down) mediante la tecnología de RNA de interferencia (iRNA) de la expresión de la enzima SOD1 y evaluación de su efecto en la regulación de la replicación y expresión génica del VHC	85
6.3.1	Silenciamiento de la SOD1 en células que expresan proteínas del VHC	85
6.4	Evaluación del efecto de la sobre-expresión transitoria de SOD1 en la regulación de la replicación y expresión génica del VHC, sistemas antioxidantes y los niveles de estrés oxidativo	87
6.4.1	Clonación del pcDNA4/HisB-SOD1	87
6.4.2	Efecto de la sobre-expresión de SOD1 en la replicación del VHC ...	89

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN

	91
7.1	Modelos de estudio del VHC	92
7.2	Modulación de los sistemas antioxidantes por la presencia de partículas del VHC	92
7.3	Inhibición de la expresión viral por AAS	94
7.4	Efecto del silenciamiento de la expresión de SOD1	95

7.5	Efecto de la sobre-expresión de SOD1	95
-----	--	----

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES	96
------------------------------------	-------	----

CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA	98
----------------------------------	-------	----

ANEXOS	112
---------------	-------	-----

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	125
-------------------------------	-------	-----

LISTA DE TABLAS

Numero	Contenido	Página
1.	Moléculas que se encuentran en fase de estudio para el tratamiento antiviral específico del VHC	31
2.	Proteínas virales. Función y peso molecular de las proteínas NS y S del VHC	36
3.	Modelos de estudio del VHC.....	41
4.	Secuencia de primers para qPCR	67
5.	Secuencia de primers para SOD1.....	87

LISTA DE FIGURAS

Numero	Contenido	Página
1.	Prevalencia de hepatitis C	19
2.	Biología Molecular del VHC.....	35
3.	Ciclo de replicación del VHC.....	39
4.	Genoma VHC y Replicón Subgenómico.....	41
5.	Genoma VHC completo, Replicon subgenómico JFH-1, genoma quimérico completo J6/JFH y genoma quimérico completo H77/JFH.....	43
6.	Efecto del AAS en los niveles del RNA viral.....	50
7.	Efecto del AAS en los niveles las proteínas virales.....	51
8.	El AAS disminuye los niveles de la proteína COX-2.....	51
9.	El AAS disminuye los niveles de proteínas oxidadas en células Huh7 replicón.....	53
10.	El AAS disminuye los niveles de lípidos oxidados en células Huh7 replicón.....	54
11.	El AAS aumenta la actividad de la enzima SOD en las células Huh7 replicón.....	55
12.	El AAS disminuye la actividad de la enzima GPx en células Huh7 replicón.....	56
13.	Niveles de marcadores de estrés oxidativo en pacientes infectados con VHC (modificada).....	58
14.	Estrategia experimental.....	62
15.	Caracterización del plásmido pJFH1.....	73
16.	Purificación del plásmido pJFH1.....	74
17.	Plásmido pJFH1 linearizado.....	75
18.	RNA del VHC-JFH1.....	76
19.	Ensayo de transfección de células Huh7.5.1.....	77
20.	Expresión del RNA del VHC.....	78
21.	Ensayo de infección en células Huh7.5.1.....	79
22.	Niveles de expresión de proteínas celulares antioxidantes y virales.....	81
23.	qPCR de los sistemas antioxidantes.....	82
24.	Expresión de NS3 y core en células infectadas con el VHC, tratadas con AAS 4 mM.....	84
25.	Ensayo de citotoxicidad MTT.....	85
26.	Efecto del silenciamiento de la SOD1 en la expresión del VHC.....	86
27.	Electroforesis del PCR SOD1 y GAPDH.....	88
28.	Clonación del plásmido pcDNA4/HisB-SOD1.....	89
29.	Efecto de la sobre-expresión de la SOD1 en la replicación del VHC.....	90

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

aa	Aminoácidos
AAS	Ácido acetil salicílico
ADMEM	Medio Advanced-DMEM
ALT	Alanina aminotransaminasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosin trifosfato
°C	Grados Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
COX	Ciclooxigenasa
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Threshold cycle, del inglés
Cu	Cobre
DAA	Agentes antivirales directos
Da	Daltones
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's media
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
ECMV	Virus de la encefalomiocarditis
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfatasa
GPx	Glutación peroxidasa
GTP	Guanosin trifosfato
h	Horas
IFN	Interferón
IL28	Interleucina 28
IRES	Sitio de entrada interna al ribosoma, del inglés
JFH1	Hepatitis fulminante japonesa 1
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
LB	Medio Luria
M	Molar
mA	Miliamper
min	Minutos
mL	Mili litros
µM	Micromolaridad
mM	Milimolaridad
Mn	Manganeso

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS ...(continuación)

MOPS	Ácido morfolino propano sulfónico
MTT	Metil tiazol tetrazolio
MWM	Marcador de peso molecular
ng	Nanogramos
NIH	National Institute of Health
nM	Nanomolaridad
nm	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de sales de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Pegilado
pH	Potencial de hidrógeno
PSA	Persulfato de amonio
qPCR	PCR cuantitativa
RBV	Ribavirina
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Acido Ribonucleico
iRNA	RNA de interferencia
mRNA	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés reactive oxygen species
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
s	Segundos
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa, del inglés severe combined immunodeficiency
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
SSA	Secretaría de Salud
SVR	Respuesta viral sostenida
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Buffer de sales de tris
TE	Buffer Tris-EDTA
TEMED	Trimetiletilendiamina
TTP	Timidin trifosfato
UTP	Uracil trifosfato
UV	Ultravioleta
V	Volts
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Zn	Zinc

RESUMEN

Presenta: MC Jose Angel Merino Mascorro

TITULO. Estudio de la participación de la superóxido dismutasa (SOD) en la regulación de la replicación del virus de la hepatitis C (VHC). **INTRODUCCIÓN.** La infección crónica por el VHC esta presente en alrededor del 3% de la población mundial, la infección crónica puede evolucionar a cirrosis y hepatocarcinoma, representando un problema importante de salud global. Ha sido reportado que el estrés oxidativo y su regulación por los sistemas antioxidantes, juega un rol importante en el establecimiento y desarrollo de la infección por el VHC, sin embargo estos mecanismos aun no han sido descritos por completo, el porqué y cómo el VHC manipula estos fenómenos para establecerse en la célula, siguen sin conocerse. Nuestro grupo de investigación ha reportado el efecto antiviral de ácido acetil salicílico AAS contra el VHC. Los resultados sugieren que este efecto puede estar asociado al balance de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y que esto puede ocurrir en parte por la inducción de la SOD. **OBJETIVO.** Evaluar la participación de la enzima SOD1 en la expresión génica e inhibición de la replicación del VHC. **MATERIAL Y MÉTODOS.** Células Huh7.5.1 fueron cultivadas para generar las partículas infecciosas del VHC. Las partículas infecciosas generadas se utilizaron para infectar hepatocitos naïve. Se analizó a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72h) la expresión a nivel transcripcional y traduccional de las enzimas Cu/ZnSOD y MnSOD, por qPCR y western blot respectivamente. También se evaluó por qPCR la expresión de los genes de la glutatión peroxidasa (GPx) y de la catalasa (CAT), comparando los niveles de expresión contra los de células no infectadas. Se trataron células infectadas con el VHC con AAS (0, 24, 48 y 72h) y se evaluó la expresión de proteínas estructurales y no estructurales del VHC por western blot. Se realizaron ensayos de silenciamiento génico (knockdown) utilizando RNA de interferencia (iRNA) dirigido contra la SOD1, en células que expresan proteínas no estructurales del VHC. La expresión de SOD1 y de la proteína NS5A, fueron medidos por qPCR y se compararon contra células sin iRNA. Se generó un vector plasmídico para la expresión de SOD1, se realizaron ensayos de transfección transitoria (36h) a diferentes concentraciones de plásmido y se midieron los niveles de expresión de proteína del VHC. **RESULTADOS.** Los niveles de expresión de proteína SOD1 están disminuidos (50% a las 72 h, $p \leq 0.05$) en células infectadas con el VHC. No se observaron cambios en los niveles de SOD2 en los niveles de SOD2. A nivel transcripcional la expresión de mRNA-SOD1 y mRNA-SOD2 no mostró cambios (0-72h). Los niveles de mRNA-GPx se ven disminuidos (60% a las 72h) y los niveles de mRNA-CAT permanecen estables. El tratamiento con AAS redujo la expresión de proteínas estructurales y no estructurales del VHC. Los ensayos de viabilidad mostraron que el AAS mM es ligeramente citotóxico a las 72h. Se logró el silenciamiento de SOD1 (60% a las 48 y 72h). El silenciamiento de SOD1 tiene un efecto negativo en la expresión del VHC (50% a las 48 y 72h $p \leq 0.05$). Se logró la sobre-expresión de SOD1 y se observó que disminuye la expresión de la proteína NS5A cuando se utilizan 250 ng del plásmido-SOD1. **CONCLUSIÓN.** La presencia de partículas virales modifica la expresión de los genes SOD1 y GPx. El silenciamiento de la SOD1 regula negativamente la expresión del RNA-VHC, y la sobreexpresión también tiene un efecto negativo en la expresión de proteínas virales, dependiente de la concentración. El ASA demostró tener un efecto antiviral en células infectadas con el VHC. Nuestros resultados sugieren que la SOD1 tiene un rol dual en la modulación de la replicación del VHC, la cuál condiciona la regulación de los sistemas antioxidantes.



Dra. Ana María Rivas Estilla
Director de Tesis

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología por infección con VHC

1.1.1 Epidemiología Mundial

La infección crónica con el VHC es un problema serio de salud mundial, el cual afecta al 3% de la población mundial. Se estima que alrededor de 170-200 millones de personas están infectadas con el virus¹⁻⁴, siendo el genotipo 1 el más dominante, seguido de los genotipos 2 y 3⁵. La distribución de la infección por VHC es altamente variable (figura 1). La prevalencia más alta, fue reportada en África (Egipto y Camerún >10%) y el Medio Oeste. La prevalencia en las Américas, Australia, Europa del Norte y del oeste^{3,4}, es menor. En números absolutos, los lugares con más individuos infectados son China (29.8 millones), India (18.2 millones), Egipto (11.8 millones), Pakistán (9.4 millones) e Indonesia (9.4 millones)³. A pesar de la baja incidencia en Asia, alrededor del 50% de personas infectadas están en esta región, siendo factor principal de ello la elevada población en los países asiáticos³. El Centro Europeo para la prevención y Control de Enfermedades reportó un aumento en la incidencia total de infección por VHC de 4.5 por 100,000 personas-año en 1995 a 8.5 por 100,000 personas-año en el 2005⁶.

La mayoría de los países desarrollados en América del Norte⁷, Europa del Norte y del Oeste⁸⁻¹¹, así como Australia y Japón, se catalogan como países de baja prevalencia (<2%).

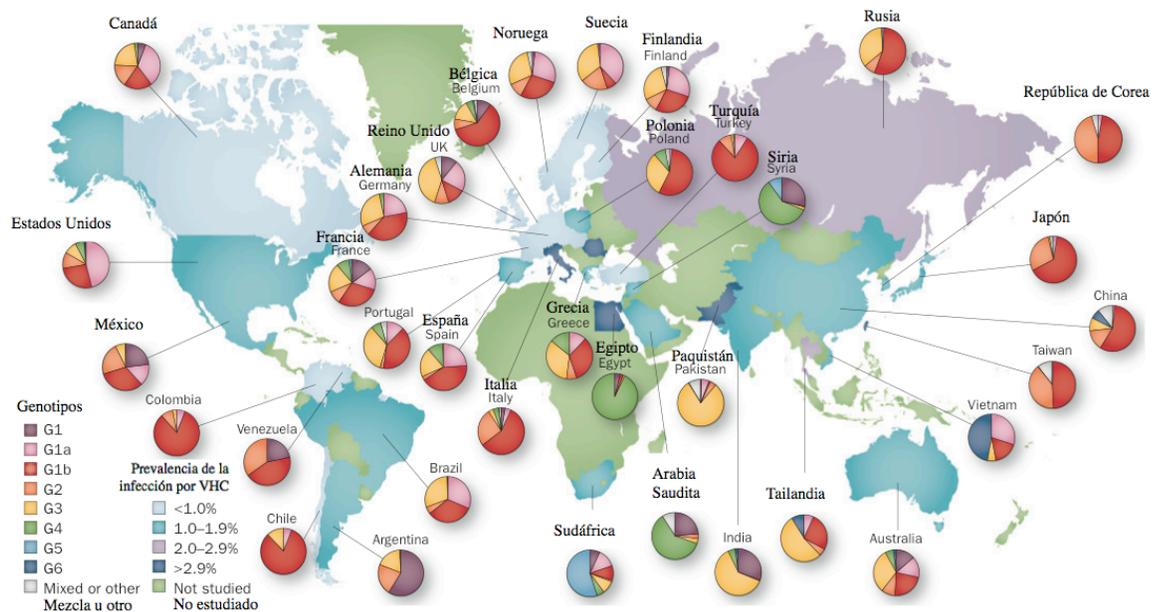


Figura 1. Prevalencia de la infección por VHC y distribución de los diferentes genotipos del VHC alrededor del mundo¹².

1.1.2 Epidemiología en México

En México se ha reportado que el genotipo 1 subtipo A es el más prevalente, con una prevalencia de 33%, seguido del genotipo 1 subtipo B con 21.4% y del genotipo 2 subtipo A con 8.50%¹³. La infección por VHC es una enfermedad de distribución mundial con transmisión exclusiva humano-humano. De todos los individuos afectados por este virus, el 85% desarrollan infección crónica, el 20% cirrosis, y de estos, el 4% carcinoma hepatocelular, mientras

que el 20% de los pacientes presentarán el cuadro clínico agudo¹⁴⁻¹⁶. México se encuentra dentro de los países de Latinoamérica con una prevalencia intermedia, reportándose del 1.4-1.6%^{17,18}.

1.1.3 Transmisión

La exposición por vía parenteral al VHC es la manera más eficiente de transmisión. La mayoría de los pacientes infectados con el VHC en Europa y los Estados Unidos han adquirido la enfermedad por el consumo de drogas vía intravenosa o por transfusión sanguínea. Considerando esta última vía, está ha disminuido desde que se empezaron a hacer análisis de rutina para la detección del VHC en los 1990s. Se han identificado las siguientes posibles rutas de infección en donadores anti-VHC positivos (orden descendente de riesgo): consumo de drogas por inyección, transfusión sanguínea, tener relaciones sexuales con consumidores de drogas intravenosas, encarcelamiento prolongado, sacrificios religiosos, haber sido golpeado o cortado con un objeto ensangrentado, perforaciones en los oído u otras partes del cuerpo e inyección de inmunoglobulinas. Comunmente en pacientes recién diagnosticados con infección por VHC, el factor de riesgo no puede ser identificado.

1.2 Manifestaciones clínicas

El espectro de las manifestaciones clínicas por la infección con el VHC varía en la enfermedad aguda y la enfermedad hepática. La infección aguda es

mas bien asintomática¹⁹ y lleva a infección crónica en el 75% de los casos. Las manifestaciones de la infección crónica van desde un estado asintomático hasta cirrosis y carcinoma hepatocelular²⁰. La infección por VHC usualmente progresa lentamente. Por lo tanto, en muchos pacientes si la infección es adquirida en etapas avanzadas de la vida, puede no resultar una enfermedad hepática clínica aparente. Aproximadamente del 20-30% de los individuos infectados crónicamente desarrollan cirrosis en un periodo de 20-30 años²⁰.

1.2.1 Hepatitis aguda

Después de la inoculación del VHC, hay un periodo variable de incubación. El RNA del VHC en sangre (o hígado) puede ser detectado por PCR dentro de un rango de días, hasta las ocho semanas. Las aminotransferasas se encuentran elevadas aproximadamente a las 6-12 semanas posteriores a la exposición (rango 1-26 semanas). Los niveles de elevación de las aminotransferasas varían considerablemente entre los individuos, pero tienden a ser de 10-30 veces más del límite normal (usualmente alrededor de 800 U/l)¹⁹. Los anticuerpos contra el VHC se pueden detectar a las 8 semanas después de la exposición, aunque en algunos pacientes pueden tomar varios meses para detectarse por ELISA. De cualquier manera, la mayoría de los pacientes nuevos infectados serán asintomáticos y tendrán un curso clínicamente no aparente o mediano. El monitoreo periódico para la hepatitis C es mandatorio para ciertos grupos de alto riesgo²⁰.

Otros síntomas que pueden ocurrir son similares a otras formas de hepatitis viral aguda, incluyendo malestar, náuseas y dolor del cuadrante superior derecho. En los pacientes que experimentan dichos síntomas de hepatitis aguda, la afección dura típicamente de 2-12 semanas. En conjunto con los síntomas clínicos, los niveles de aminotransferasas se normalizarán en el 40% de los pacientes. La pérdida de RNA del VHC, que indica la cura de la hepatitis C, ocurre en menos del 20% de los pacientes, independientemente de la normalización de las aminotransferasas. La muerte por falla hepática fulminante debido a infección por VHC es rara²⁰.

1.2.2 Hepatitis C crónica

El riesgo de infección crónica por VHC es alto, 75-100% de los pacientes con infección aguda siguen siendo positivos al RNA VHC^{19,21}. La mayoría de estos pacientes tendrán los niveles de las enzimas hepáticas elevadas durante el seguimiento. Por definición, la hepatitis C es marcada como crónica después de una persistencia de más de seis meses. Una vez que la infección crónica se ha establecido, hay una tasa muy baja de resolución espontánea. Aun no está claro porque la infección con VHC resulta en una infección crónica en la mayoría de los casos. La diversidad genética del virus y su tasa alta de mutación puede permitirle al VHC escapar del reconocimiento inmune. Factores del huésped pudieran estar involucrados en la habilidad de aclarar al virus, como los asociados con la producción de anticuerpos que reconocen las proteínas estructurales del virus. Factores que se han asociado al aclaramiento

exitoso del virus son la respuesta de células T CD4 específicas contra el VHC, altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas estructurales del virus, polimorfismos en el gen IL28B y alelos específicos HLA-DRB1 y DQB1²²⁻²⁴. La infección con el VHC durante la infancia parece estar asociada con un bajo riesgo de infección crónica, de aproximadamente 50-60%²⁵. Finalmente, parecen existir diferencias étnicas que propician bajo riesgo de cronicidad en ciertas poblaciones, lo que pudiera explicarse en parte por la distribución diferencial de ciertos genotipos de los hospederos, como el del gen IL28B²⁶. La mayoría de los pacientes con infección crónica son asintomáticos o tienen solamente síntomas medianos no específicos, ya que la cirrosis no está presente^{22,27}. El síntoma más frecuente es fatiga. Los niveles de aminotransferasas pueden variar considerablemente sobre la historia natural de la enfermedad crónica. Muchos de los pacientes tienen únicamente una ligera elevación de éstas. Hasta un tercio de los pacientes tienen niveles normales de alanina transaminasa (ALT) sérica^{28,29}. Cerca del 25% de los pacientes tienen los niveles de ALT entre 2 y 5 veces por encima de los niveles máximos normales. Elevaciones de hasta 10 veces por encima del límite normal son raramente vistos. Hay una pobre correlación entre las concentraciones de aminotransferasas e histología hepática; incluso pacientes con ALT sérica normal muestran evidencia histológica de inflamación crónica en la mayoría de los casos³⁰. El grado de daño típicamente es mínimo o moderado en estos pacientes. De acuerdo a esto, la normalización de los niveles de aminotransferasas, después de la terapia con interferón, no reflejan necesariamente una mejora histológica.

1.2.3 Historia Natural

El riesgo de desarrollar cirrosis en 20 años se estima que está cerca de 10 a 20%, aunque algunos estudios indican que puede ser de hasta 50%³¹⁻³⁴. Debido a que el curso de la enfermedad es largo, es difícil de determinar el riesgo exacto y los escenarios son divergentes para diferentes estudios y poblaciones. De hecho, la hepatitis C crónica no es necesariamente progresiva en todos los pacientes afectados. En varias cohortes se ha mostrado que un número sustancial de pacientes no desarrolla cirrosis durante un cierto periodo de tiempo. Se ha estimado que acerca del 30% de los pacientes no desarrollará cirrosis por lo menos en 50 años³¹. Por lo tanto, estudios con periodos cortos de observación, en ocasiones fallan en mostrar un incremento en la mortalidad. Aunado a esto, la supervivencia generalmente no se ve afectada, sino hasta que la cirrosis se ha desarrollado. Por otra parte, no hay duda de que los pacientes con hepatitis C crónica tienen un alto riesgo de cirrosis, descompensación, y carcinoma hepatocelular en un seguimiento a periodos largo. Por ejemplo, en una cohorte de pacientes con hepatitis C post-transfusión que fueron evaluados mas de 20 años después de la transfusión, 23% tenía hepatitis crónica activa, 51% cirrosis y 5% carcinoma hepatocelular³⁵. No está completamente entendido aun el porque existen tales diferencias con respecto a la progresión de la enfermedad. Se debe asumir que es por la interacción entre el virus y el hospedero.

1.2.4 Cirrosis y descompensación hepática

Las complicaciones en la hepatitis C ocurren casi exclusivamente en pacientes que han desarrollado cirrosis. Interesantemente, la mortalidad no relacionada a causas hepáticas es alta en pacientes con cirrosis también. De cualquier manera la cirrosis puede ser muy difícil de diagnosticar clínicamente, debido a que la mayoría de los pacientes cirróticos serán asintomáticos, siempre y cuando no ocurra una descompensación hepática. Hallazgos que pueden relacionarse a cirrosis son la hepatomegalia y/o esplenomegalia en el examen físico, concentraciones elevadas de bilirrubina en suero, hiperalbuminemia, o niveles bajos de plaquetas. Otros hallazgos clínicos asociados a enfermedad hepática crónica pueden ser angioma estelar, cabeza de medusa, eritema palmar, atrofia testicular o ginecomastia. La mayoría de estos, se encuentran en menos de la mitad de los pacientes con cirrosis y, por lo tanto, ninguno es suficiente para establecer un diagnóstico. La descompensación hepática puede ocurrir de diversas maneras, la más común es ascitis, seguida por hemorragia de varices, encefalopatía e ictericia. La descompensación hepática sólo ocurre en pacientes con cirrosis, no obstante no todos los pacientes cirróticos muestran signos de descompensación. El riesgo de descompensación se estima que ronda el 5% de los pacientes por año³¹. Una vez que se ha desarrollado la descompensación, la tasa de supervivencia a 5 años es cercana al 50%³⁶. Para este grupo de pacientes, el trasplante de hígado es la única terapia.

De manera similar a la descompensación, el carcinoma hepatocelular se desarrolla únicamente en pacientes con cirrosis. El riesgo se estima que es menor al 3% por año una vez que se ha desarrollado cirrosis^{37,38}. De cualquier manera el hepatocarcinoma asociado al VHC tiene un fuerte impacto negativo en la supervivencia.

1.2.5 Progresión de la enfermedad

La hepatitis C crónica se desarrolla de manera diferente entre los individuos. Aun no se ha entendido por completo el por qué de estas diferencias en la progresión de la enfermedad. Diversos factores han sido identificados, los cuales pudieran asociarse a dichas diferencias.

1) Edad y género: Adquirir la enfermedad después de los 40 años y hasta los 55 años puede estar asociado a una progresión más rápida del daño hepático, así como el género masculino³⁹. Por el contrario, los infantes parecieran tener un riesgo relativamente bajo en cuanto a la progresión de la enfermedad.

2) Origen étnico: En Afro-Americanos, la progresión del daño parece ser más lenta y los cambios en histología hepática menos severos⁴⁰.

3) Respuesta inmune celular VHC específica: La severidad del daño hepático esta influenciada por la respuesta celular inmune al VHC. La respuesta inflamatoria está regulada por mecanismos complejos y probablemente depende de determinantes genéticas, como la expresión del HLA⁴¹. Aun no está claro, si esto es un factor para la progresión de la enfermedad hepática.

4) Ingesta de alcohol: El alcohol incrementa la replicación del VHC, potencia la progresión de la infección crónica y acelera el daño hepático⁴¹. Incluso cantidades moderadas de alcohol parecen aumentar el riesgo de fibrosis. De acuerdo a esto, en pacientes alcohólicos con cirrosis y falla hepática, se ha descrito una prevalencia elevada de anticuerpos anti-VHC. El consumo de alcohol debe ser evitado en todos los pacientes con hepatitis C crónica.

5) Factores del hospedero: Polimorfismos genéticos de ciertos genes puede influenciar la progresión de la fibrosis⁴². Por ejemplo, el genotipo del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) o PNLPA3 (adiponutrin) están correlacionados con estadios de fibrosis⁴³. Pacientes con esteatosis de moderada a severa tienen mayor riesgo de desarrollar fibrosis hepática.

6) Co-infección viral: La progresión de la hepatitis C se ve claramente acelerada en pacientes infectados con VIH. La hepatitis B aguda puede ser más severa en pacientes infectados con VHC y una infección crónica con VHB puede estar asociada con una disminución en la replicación del VHC, opuesto a lo que pasa en la mono-infección con VHC, de cualquier manera el VHC predomina. Sin embargo, el daño hepático es más severo y la progresión en pacientes es más rápida cuando existe la infección dual VHB/VHC.

7) Geografía y factores ambientales: Existen algunas diferencias geográficas obvias⁴⁴, por ejemplo el carcinoma hepatocelular se observa con mayor frecuencia en Japón que en los Estados Unidos. La razón de esto, aun no está clara. **Uso de esteroides:** Es bien sabido que el uso de esteroides aumenta la carga viral, mientras que el efecto en las aminotransferasas es variable, ya que

tienden a disminuir en la mayoría de los pacientes, aunque incrementos en las aminotransferasas y bilirrubina también se han descrito. Una reducción en la dosis de cortico esteroides devuelve la carga viral a la línea basal.

8) Factores del virus: La influencia de los factores virales en la progresión de la enfermedad hepática no es clara. Por encima de todo, parece no haber un papel significativo entre los diferentes genotipos y quasiespecies en cuanto a la progresión de la fibrosis o en su resolución. Sin embargo, una co-infección con varios genotipos puede tener un peor pronóstico si se compara con la mono-infección. Es muy difícil predecir el curso individual de la hepatitis C, ya que este depende de muchos factores. Actualmente, el diagnóstico de la fibrosis hepática por medios no invasivos como la elastografía transitoria (FibroScan) o por el método tradicional de biopsia hepática es el mejor predictor de la progresión de la enfermedad hepática^{45,46}. El grado de inflamación y estadio de fibrosis son útiles para predecir el curso clínico.

1.3 Terapia actual

La terapia estándar de cuidado para tratamiento de pacientes con infección por VHC, ha estado compuesta por la administración de interferón α -pegilado (PEG-IFN) y ribavirina (RBV)⁴⁷, este tratamiento dual con PEG-IFN 2a (180 μ g/semana) o 2b (1.0 a 1.5 μ g/kg peso corporal/semana) y el análogo de la guanósina RBV (12 a 15 mg/kg peso corporal/día) ha estado disponible desde el 2001/2002 para pacientes con hepatitis C crónica(4-6). Estos fármacos

se administran por 48 semanas (genotipos VHC 1, 4, 5 y 6) o por 24 semanas (genotipos VHC 2 y 3), obteniendo rangos de respuesta viral sostenida (SVR) de 45-50% en pacientes infectados con el genotipo 1 y de hasta 80% en pacientes infectados con genotipo 2 y 3^{48,49}. La SVR es utilizada como un marcador subrogado para la cura y es definida como la ausencia de evidencia de RNA-VHC en sangre, después de seis meses del final del tratamiento. El blanco de la terapia antiviral es la eliminación a largo plazo del VHC en sangre. Esto previene la progresión de la enfermedad hepática, reduce el riesgo de hepatocarcinoma, mejora la calidad de vida y puede eliminar el riesgo de infección¹⁸.

El surgimiento de agentes antivirales de acción directa, ha logrado una mejora considerable en los rangos de SVR y la opción de disminuir el tiempo de terapia en pacientes con infección crónica por VHC genotipo 1. En principio, cada una de las cuatro proteínas estructurales y las seis no estructurales, estructuras del RNA-VHC específicas (IRES), así como los factores del hospedero de los que depende el virus, pueden ser blancos para agentes DAA. La investigación en este campo se ha ido desarrollando y cada vez hay mas posibles opciones para lograr una terapia efectiva. Hoy en día se cuenta con una gran diversidad de agentes dirigidos contra los diversos blancos que participan en el ciclo del virus (**Tabla 1**). Actualmente, solo se han aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) inhibidores de la proteína no estructural 3/4A (NS3/4A) del VHC, , que es una serin-proteasa necesaria para la replicación del RNA y el ensamblaje del virión, así como también cuatro inhibidores de proteasa, (boceprevir, telaprevir⁵⁰⁻⁵², simeprevir y faldaprevir)

que han demostrado una potente inhibición de la replicación del VHC genotipo 1, mejorando la SVR, la combinación de un inhibidor con PEG-IFN o RBV limita el propiciar variantes resistentes, lo que se refleja en una mejora en la respuesta antiviral⁵³.

Tabla 1. Moléculas que se encuentran en fase de estudio para el tratamiento antiviral específico del VHC.

Nombre del fármaco	Compañía	Blanco / sitio activo	Fase
Inhibidores de la proteasa NS3/4			
Telaprevir	Vortex	Sitio activo / linear	IV
Boceprevir	Merck	Sitio activo / linear	IV
Simeprevir	Janssen / Medivir	Sitio activo / macrocíclico	IV
Danoprevir	Roche / InterMune	Sitio activo / macrocíclico	III
Vaniprevir	Merck	Sitio activo / macrocíclico	III
MK-5172	Merck	Sitio activo / macrocíclico	III
Faldaprevir	Boehringer Ingelheim	Sitio activo / linear	IV
Asunaprevir	Bristol-Myers Squibb	Sitio activo	III
GS-9256	Gilead	Sitio activo	II
GS-9451	Gilead	Sitio activo	II
ABT-450	Abbot	Sitio activo	III
IDX320	Idenix	Sitio activo	II
ACH-1625	Achillion	¿Sitio activo / macrocíclico?	II
Análogos de nucleótido inhibidores de la polimerasa NS5B			
Mercitabine (R7128)	Roche / Pharmasset	Sitio activo	III
Sofosbuvir (GS-7977)	Gilead	Sitio activo	III
VX-135 (ALS-2200)	Vertex / Alios	Sitio activo	II
IDX 20963	Idenix	Sitio activo	I
ACH-1625	Achillion	Sitio activo	I
No-análogos de nucleótido inhibidores de la polimerasa NS5B			
Deleobuvir (B1207127)	Boehringer Ingelheim	NNI sitio 1 / pulgar 1	DETENIDO
BMS-791325	Bristol-Myers Squibb	NNI sitio 1 / pulgar 1	II
TMC647055	Janssen	NNI sitio 1 / pulgar 1	I
VX-222	Vertex	NNI sitio 2 / pulgar 2	II
GS-9669	Gilead	NNI sitio 3 / palma 1	II
ABT-333	Abbot	NNI sitio 3 / palma 1	III
Tegobuvir (GS-9190)	Gilead	NNI sitio 4 / palma 2	II
Setrobuvir (ANA598)	Anadys / Roche	¿NNI sitio 4? / palma 1	II
Inhibidores de la NS5A			
Daclatasvir (BMS-790052)	Bristol-Myers Squibb	Inhibidor del dominio 1 NS5A	III
BMS-824393	Bristol-Myers Squibb	Proteína NS5A	I
PPI-461	Presidio	Proteína NS5A	II
PPI-668	Presidio	Proteína NS5A	II
Ledipasvir (GS-5885)	Gilead	Proteína NS5A	III
GS-5816	Gilead	Proteína NS5A	II

Tabla 1. Moléculas que se encuentran en fase de estudio para el tratamiento antiviral específico del VHC. (continuación)

Nombre del fármaco	Compañía	Blanco / sitio activo	Fase
Inhibidores de la NS5A			
ABT-267	Abbott	Proteína NS5A	III
ACH-2928	Achillion	Proteína NS5A	I
MK-8742	Merck	Proteína NS5A	II
Agentes dirigidos al hospedero			
SCY-635	Scynexis	Inhibidor de la ciclofilina	II
Alisporivir (Debio-025)	Novartis	Inhibidor de la ciclofilina	II
Miravirsén	Santaris	RNA antisentido miRNA 122	II

El futuro del tratamiento de la hepatitis C aun tiene muchos retos, pero el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas es promisorio, ahora más que nunca. Desde hace más de 20 años se ha realizado una intensa labor en la academia, compañías biotecnológicas y empresas farmacéuticas, para conocer a profundidad el ciclo viral, lo que ha dado como resultado la aprobación de nuevos agentes antivirales directos (DAA). Estudios clínicos de fase 3 que combinan el uso de la segunda ola de inhibidores de proteasas (simeprevir o faldaprevir) con PEG-IFN y ribavirina han mejorado las tasas de SVR hasta niveles de 80% y con menores efectos adversos. Incluso niveles mas altos (SVR 90%) fueron alcanzados con el inhibidor de nucleótidos sofosbuvir, con PEF-IFN y ribavirina^{54,55}. Tasas muy altas de SVR se han observado con dos DAAs (terapia cuádruple), ya sea un inhibidor de proteasa o NS5A (asunaprevir + daclatasvir o vedoprevir (GS-9451) + ledipasvir (GS-5885)) o inhibidores de proteasa y polimerasa (danoprevir + mercitabine (RG7128))⁵⁶. Actualmente, los regímenes que utilizan múltiples DAAs, buscan alcanzar una terapia libre de IFN. De cualquier manera, aunque existe la especulación de lograr la terapia libre, el IFN-λ continua siendo evaluado como un reemplazo, debido a sus

propiedades antivirales similares y un efecto mas deseable en cuanto a los efectos colaterales. El campo del tratamiento de VHC se encuentra en medio de una gran cantidad de estudios clínicos libres de IFN, los cuales combinan uno, dos o tres agentes antivirales, con o sin ribavirina. La combinación de tres DAAs – inhibidores de proteasa, NS5A y polimerasa +/- ribavirina – han alcanzado una SVR cerca del 100% en grupos relativamente grandes de pacientes infectados con VHC genotipo 1. El uso de los nuevos DAAs para el tratamiento de los otros genotipos aun sigue siendo un reto a lograr, la combinación de DAAs y ribavirina mejora ligeramente la SVR en pacientes con el genotipo 2, pero no se han observado mejoras cuando se tratan pacientes con genotipo 3. La investigación y los ensayos clínicos deben continuar para conseguir el desarrollo de una terapia que funcione y esté disponible para todos los pacientes infectados.⁵⁷

1.4 Virología molecular del VHC

La familia *Flaviviridae* se divide en cuatro géneros: flavivirus, pestivirus, hepacivirus y, un nuevo género que se ha definido, pegivirus⁵⁸. Los flavivirus incluyen a los virus de la fiebre amarilla, virus de fiebre de dengue y virus de la encefalitis Japonesa. Los pestivirus incluyen al virus de la diarrea viral bovina, virus de la fiebre porcina clásica y virus de la enfermedad de la frontera. El VHC, con por lo menos 6 genotipos y sus diversos subtipos, es miembro del género hepacivirus⁵⁹. Los flavivirus comparten ciertas características estructurales y virológicas básicas, siendo todos virus envueltos en una bicapa

de fosfolípidos, en la que dos o más proteínas de envoltura (E) están ancladas. La envoltura que rodea la nucleocápside se compone de múltiples copias de una proteína pequeña (core ó C), y contiene el genoma de RNA. El genoma es una de molécula de RNA de hebra positiva, que oscila entre 9.6 a 12.3 miles de nucleótidos (nt), con un marco abierto de lectura (del inglés ORF) codificante para una poliproteína de 3000 amino ácidos (aa) o más. Las proteínas estructurales están codificadas por la parte N-terminal del ORF, mientras que la porción remanente del ORF codifica para las proteínas no estructurales (NS)⁶⁰. Las secuencias para la RNA proteasa-helicasa y la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), son muy conservadas y se ubican en posiciones similares a las de las poli-proteínas de todos los flavivirus⁶¹. Los flavivirus se unen a uno o más receptores celulares, organizados en forma de un complejo y parece que esto activa la endocitosis mediada por receptor. La fusión de la envoltura del virión con las membranas celulares libera la nucleocápside en el citoplasma. Posterior a esto, la transcripción del genoma viral ocurre en el citoplasma, generando un precursor de una poliproteína, la cual es modificada por proteasas virales y celulares, para dar lugar a proteínas estructurales y no estructurales. La replicación del genoma viral es llevada a cabo por un complejo de replicación, que se asocia a membranas celulares y ocurre *vía* síntesis de intermediarios de RNA de polaridad negativa⁶⁰. A diferencia de otros flavivirus, la región 5' no traducida (UTR), no tiene casquete y de manera similar a otros pestivirus, se pliega, junto con una porción del dominio que codifica para la proteína C en un complejo de RNA con estructura secundaria para formar un sitio de entrada al ribosoma interno (del inglés IRES), que dirige la unión directa

de las subunidades ribosomales y factores celulares para la traducción. Mientras que la región 3'UTR de los flavivirus está altamente estructurada, la región 3'UTR del VHC, es relativamente corta y menos estructurada, conteniendo un fragmento de poli-uracilo de longitud variable⁶⁰. El VHC es específico en cuanto a su hospedero y a su tropismo, transmitiéndose exclusivamente por contacto de sangre directo. Por otra parte, mientras que la mayoría de los flavivirus causan una infección aguda en humanos, la infección por VHC tiende a ser crónica en la mayoría de los casos (50%-80%). Las respuestas inmunes humoral y celular han demostrado ser efectivas en infecciones por pestivirus y flavivirus, además tienen un rol importante para la recuperación y protección del huésped. Por otra parte, en el modelo de chimpancé la infección por VHC induce una respuesta inmune que falla en la prevención de la infección persistente y generalmente no confiere protección contra la reinfección de cepas homólogas o heterólogas⁶².

1.4.1 Taxonomía y genotipos

La comparación de secuencias nucleotídicas de aislados de VHC provenientes de individuos localizados en diversas regiones geográficas han revelado la existencia de por lo menos seis genotipos del VHC principalmente, con un amplio número de subtipos dentro de cada genotipo^{63,64}. Las cepas del VHC pertenecientes a los genotipos 1, 2, 3, 4 y 5 se encuentran en la África sub-sahariana, mientras que los genotipos 3 y 6 son detectados con mucha diversidad en el sureste asiático. Esto sugiere que estas regiones geográficas

pueden ser el origen de diferentes genotipos del VHC. La emergencia de diferentes genotipos del VHC en Norteamérica y Europa, así como en otros países que no son tropicales, aparenta mostrar epidemias recientes que fueron introducidas de los lugares donde el VHC es endémico⁶⁵. En un estudio muy reciente, más de 1300 regiones codificantes del VHC fueron analizadas, con el fin de validar nuevos genotipos y subtipos. Este estudio reveló que existe la presencia de al menos 7 genotipos y 67 subtipos⁶⁶.

1.4.2 Estructura y organización genómica

La región 5' UTR consiste en cuatro dominios altamente estructurados^{67,68} y contiene el IRES⁶⁹ y la región 3' UTR consistente de estructuras tipo lazo y un tramo interno poli (U) -- poli (U/C)^{70,71}. El ORF central de 9.6 kb codifica para una poliproteína de poco más de 3000 aa, dependiendo del genotipo del VHC. S y NS corresponden a regiones que codifican para proteínas estructurales y no estructurales, respectivamente (figura 2)^{70,71}.

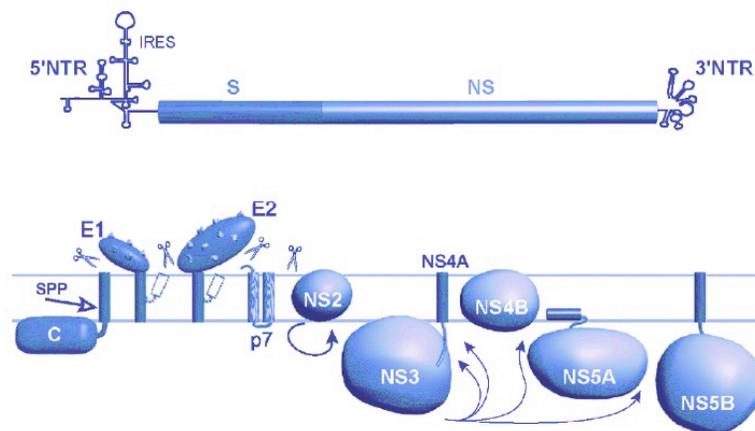


Figura 2. Biología Molecular del VHC.

El IRES de VHC tiene la capacidad de formar un complejo estable al unirse directamente a la subunidad ribosomal 40s sin la necesidad de los factores de iniciación de la traducción canónica. Este evento representa el primer paso de la traducción de la poliproteína del VHC⁷². El ORF codifica por lo menos para 11 proteínas (**Tabla 2**), que incluyen 3 proteínas estructurales: C o core, E1 y E2; una proteína pequeña denominada p7, la cual no se ha definido su función; 6 proteínas no estructurales: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B; y la proteína llamada “F”, que resulta de un marco de lectura alternativo (ARF) en la región que codifica para la proteína core⁶⁰.

Tabla 2. Proteínas NS y S del VHC.

Proteínas	Función	Peso molecular (kDa)
Core	Nucleocápside	23 (precursor) 21 (madura)
Proteína F	¿?	16-17
E1	Envoltura ¿Dominio de fusión?	33-35
E2	Envoltura Unión al receptor ¿Dominio de fusión?	70-72
p7	Ión de canal de calcio	7
NS2	Autoproteasa NS2/3	21-23
NS3	Componente de las proteasas NS2/3 y NS3/4 ^a NTPasa/helicasa	69
NS4A	Cofactor de la proteasa NS3/4A	6
NS4B	Inducción de la red membranosa	27
NS5A	Replicación de RNA por la formación de complejos de replicación	56 (basal) 58 (hiperfosforilada)
NS5B	RNA-polimerasa dependiente de RNA	68

1.4.3 Ciclo viral

A pesar de que el virus fue descubierto desde 1989, el conocimiento acerca del ciclo viral no ha sido completamente descrito. El estudio de nuevas terapias y el conocimiento de la infección viral en estudios básicos y clínicos requiere de modelos representativos *in vitro* o *in vivo*, los sistemas *in vitro* están limitados por el tipo de líneas celulares y cepas virales que puedan cultivarse para su estudio^{73,74}. Por otra parte no hay un modelo animal pequeño que pueda utilizarse para reproducir por completo el ciclo viral y la patogénesis en la infección por VHC. El chimpancé es el único animal que puede ser empleado para el estudio de la enfermedad^{75,76}. Se han realizado diversas investigaciones para la elucidación del mecanismo de entrada del VHC al hepatocito. Pero a pesar de los esfuerzos realizados, aun no está completamente definido el o los receptores responsables. El tropismo hepático no ha podido ser explicado en su totalidad, aunque se sabe que este ocurre y de manera específica. Varios receptores celulares se han propuesto como mediadores de la unión e internalización del VHC, siendo el CD81 ha sido el más estudiado⁷⁷ pero este se expresa en diversos tipos celulares, lo que apunta a la presencia de un complejo de receptores presentes en la célula para conferir su permisividad a la infección por VHC. Es posible que el receptor CD81 actúe como un co-receptor de entrada, posterior a la unión y que otros factores celulares en conjunto sirvan para la unión e internalización del VHC a los hepatocitos⁷⁸. El receptor basurero B tipo I (del inglés SR-BI), el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) y las integrinas CD209 y CD209L, también se han propuesto como candidatos a

receptor del VHC⁶⁰. Posterior a la adhesión, la nucleocápside del virus envuelto es liberada al citoplasma celular como resultado de la fusión entre las membranas virales y celulares. Los flavivirus entran a sus células diana por una endocitosis mediada por receptor y utilizan proteínas de fusión de clase II⁵⁹. La entrada del VHC depende del pH y de la endocitosis, el péptido de fusión sigue en controversia, estudios de estructura en cristalografía 3D y crioespectroscopia de masas, indican que tanto la glicoproteína E1, que presenta un péptido de fusión en su ectodominio^{79,80}, como la E2, que tiene similitud estructural con las proteínas de fusión clase II^{81,82}, son necesarias para el entendimiento de los mecanismos de fusión del VHC. La descapsidación de las nucleocápsides virales libera las cadenas de RNAs genómicos positivos en el citoplasma, donde sirven junto con los RNAs recién sintetizados como RNAs mensajeros para la síntesis de la poliproteína del VHC. La traducción ocurre bajo el control del IRES, el cual media la iniciación interna independiente de casquete, manipulando proteínas celulares y virales.

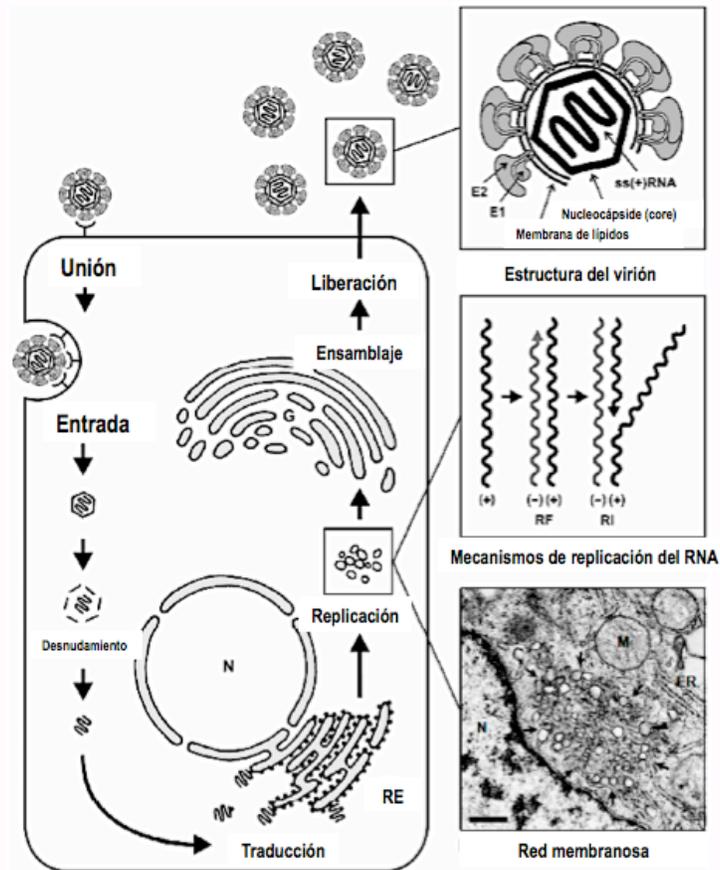


Figura 3. Ciclo de replicación del VHC. La partícula viral se une a la célula huésped por la interacción de sus glicoproteínas y receptores celulares. Las partículas son internalizadas por endocitosis. El genoma viral se desnuda y es traducido. Después de la amplificación del genoma y la expresión de proteínas virales, la progenia viral es ensamblada. Los viriones maduros son liberados al medio extracelular.

Las partículas virales se unen a la célula huésped por la interacción específica entre las glicoproteínas de envoltura y un receptor celular desconocido. Las partículas unidas son internalizadas por endocitosis, después del desnudamiento y de la traducción en el retículo endoplásmico (RE) rugoso, la NS4B induce la formación de vesículas membranosas, las que sirven como andamios para el complejo de replicación viral. Posterior a la amplificación del genoma y la expresión, la progenie viral se ensambla, aunque el sitio específico

aun no se ha identificado, puede que ocurra en las membranas intracelulares derivadas del RE o aparato de Golgi. Las partículas recién producidas abandonan la célula huésped por la vía secretoria constitutiva (figura 3).

Aunque se ha progresado en el estudio y comprensión de el VHC, el hecho de que existan “cuasi-especies” en los pacientes debido a la elevada tasa de mutación, representa un problema emergente para las nuevas moléculas inhibitoras para el VHC⁸³. Pero las nuevas alternativas de sistemas celulares robustos para la infección con VHC, facilitará el desarrollo de las diferentes estrategias terapéuticas contra las diferentes etapas del ciclo viral del VHC.

1.5 Modelos de estudio

Los sistemas de cultivo celular son necesarios para estudiar el ciclo de replicación y para desarrollar estrategias profilácticas y/o intervenciones terapéuticas. Un sistema depende de una célula hospedera, la cual sostenga la producción de progenie viral y de un virus que sea capaz de replicarse y formar partículas infecciosas en cultivo celular. El desarrollo de modelos de estudio in vivo e in vitro ha sido crucial para el estudio del VHC. Estos incluyen, entre otros, clonas funcionales de cDNA que son infecciosas in vivo en chimpancés, el sistema replicón, pseudopartículas retrovirales que presentan glicoproteínas de envoltura del VHC (VHCpp) y los sistemas completos de cultivo celular (**Tabla 3**).

Tabla 3. Modelos de estudio del VHC

Modelos <i>in vitro</i>	Modelos <i>in vivo</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas de replicación 	<ul style="list-style-type: none"> • Chimpanzee
<ul style="list-style-type: none"> • Pseudopartículas VHC (VHCpp) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ratón con hígado quimérico humano
<ul style="list-style-type: none"> • VHC derivado de cultivo (VHCcc) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ratones genéticamente humanizados

El estudio del VHC en modelos celulares fue imposible hasta el desarrollo de los replicones subgenómicos que se replican de manera autónoma en la línea de hepatoma humano Huh-7. Las primeras clonas de cDNA funcionales del VHC fueron construidas en 1997 (Lohmann)⁸⁴. Este sistema fue desarrollado al observarse que las proteínas estructurales no eran requeridas para la replicación de la cadena de RNA (+) del VHC. Sin embargo, para alcanzar la replicación eficiente en cultivo celular, el RNA viral necesitaba mutaciones adaptativas. La estructura se compone del replicón bicistrónico Con1, el cual se compone del extremo 5' UTR y de 12 aminoácidos de la región que codifica para la cápside del VHC, unido al gen Neo, el IRES del Virus de la Encefalomiocarditis (EMCV), la región que codifica para las proteínas NS 3-5B y la región 3' UTR (figura 4)⁸⁵.

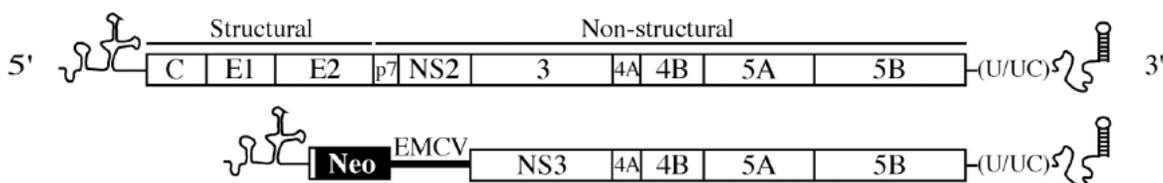


Figura 4. Genoma VHC y Replicón Subgenómico.

Muchos aspectos del ciclo viral del VHC aun no se han reproducido en cultivo celular, aunque se han realizado muchos intentos para establecer modelos in vivo que mimeticen la replicación del VHC, en 1999 se obtuvo suero de un paciente con hepatitis fulminante, un hombre de 32 años de edad que fue admitido con un cuadro con fatiga general, fiebre elevada y disfunción hepática. El paciente no tenía antecedentes de enfermedad hepática, consumo de drogas o alcohol y en los 6 meses anteriores no había sido transfundido ni había tenido contacto sexual con algún portador de VHC⁸⁶. El paciente presentaba niveles séricos elevados de transaminasas hepáticas, niveles bajos de tiempo de protrombina y presentaba una encefalopatía en etapa II. Se le detectó RNA de VHC por RT-PCR y los anticuerpos anti-VHC fueron negativos, al igual que todos los marcadores para hepatitis virales, por lo que fue diagnosticado de hepatitis fulminante asociada a VHC. El paciente presentaba niveles elevados de viremia, 10^5 copias/mL en la admisión y 10^4 copias/mL 25 días después. Para investigar el rol de la cepa de hepatitis fulminante, se aisló el RNA de VHC en la etapa aguda del paciente, se amplificó por RT-PCR, se clonó el cDNA y se le determinó su secuencia. A la clona se le designó el nombre de JFH-1, y se reveló que correspondía al el genotipo VHC 2a. Posteriormente con el conocimiento y experiencia del modelo replicón subgenómico, se logró en el 2005 el desarrollo del modelo de replicón genómico y de expresión completa del VHC JFH-1 en cultivo celular (fig. 5)^{86,87}, que es utilizado en el estudio del ciclo viral completo y de las nuevas alternativas terapéuticas.

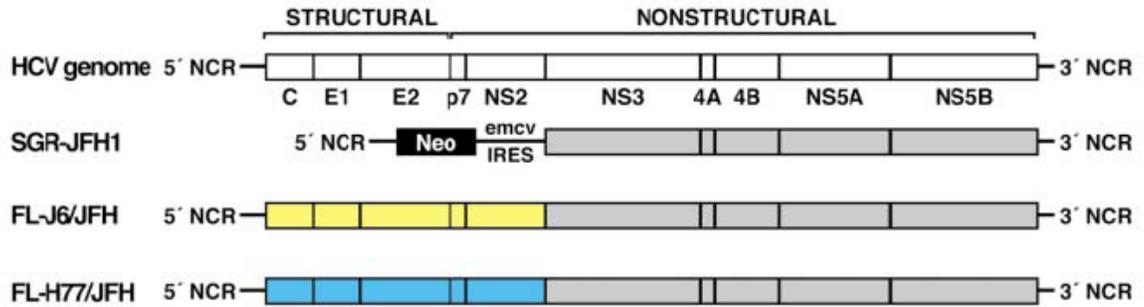


Figura 5. Genoma VHC completo, Replicón subgenómico JFH-1, genoma quimérico completo J6/JFH y genoma quimérico completo H77/JFH.

A la secuencia total del cDNA JFH-1 clonada (uniendo fragmentos de RT-PCR para la producción de la secuencia completa) se le adicionó al inicio la secuencia del promotor T7, por lo que utilizando la T7 RNA polimerasa se obtiene el RNA de la secuencia completa del JFH-1. Este se utilizó en ensayos de transfección en células Huh7 naïve y la replicación viral, así como la producción de proteínas virales fueron detectadas en las células post-transfección. Para determinar la capacidad de infección de las partículas virales generadas en cultivo celular, células Huh7 naïve fueron expuestas con el medio de cultivo de las células transfectadas^{86,87}. La infección pudo determinarse por inmunofluorescencia indirecta, aunque los títulos de infección fueron bajos. La capacidad de infección de las partículas virales generadas en cultivo celular también se comprobó en el modelo animal de chimpancé por el grupo de Liang (NIH, Bethesda, Maryland)⁸⁸. Estos experimentos confirmaron la infección *in vivo* e *in vitro*.

El único modelo animal pequeño que puede ser infectado con el VHC, es el ratón con deficiencia en células T y B que resulta en una inmunodeficiencia

severa combinada (SCID), el cuál es trasplantado con hepatocitos humanos⁸⁹. Los primeros estudios de infección con VHC en este modelo murino fueron realizados por Mercer et al (2001)⁹⁰. El estudio mostró que el ratón SCID con una alteración genética que provocaba la degradación de sus hepatocitos, sobre expresaba un transgen activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Con esta mutación los ratones podían ser injertados con hepatocitos humanos primarios y posteriormente ser infectados con el VHC, pero esto llevaba a una alta mortalidad en el modelo de ratón uPA-SCID, debido a que los hepatocitos primarios frescos o congelados deben ser trasplantados intraesplénicamente, durante las primeras 2 semanas de vida⁹¹⁻⁹³. La mayoría del hígado de ratón requiere la repoblación con hepatocitos humanos funcionales, para poder presentar susceptibilidad a la infección por VHC. El ratón quimérico puede ser infectado por un inóculo de partículas generadas *in vivo* o *in vitro*, pero también puede ser infectado por inyección intrahepática del RNA de las clonas del VHC⁸⁹.

1.6 VHC y estrés oxidativo

La presencia de estrés oxidativo durante la hepatitis C crónica (CHC) fue detectada tempranamente en los mediados de la década de 1990. Hasta ahora la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ha cambiado los puntos de abordaje de estudio, incluyendo la medición de: ROS, antioxidantes, expresión de niveles y actividades de enzimas de defensa antioxidante y

productos de interacción con ROS y moléculas biológicas. La detección de estos compuestos se ha realizado en biopsias de pacientes con hepatitis crónica, sugiriendo la participación directa del VHC. De igual manera en muestras de sangre se ha dado una gran importancia a la correlación de estos compuestos/enzimas y el curso de la enfermedad en el hígado.

Las ROS se producen normalmente durante los procesos de metabolismo aeróbico, estrés continuo y exposición a luz UV o rayos X. Estas especies reactivas de oxígeno juegan un rol en muchas vías de señalización en diferentes organismos, desde bacterias hasta células de mamíferos. Antes eran considerados como metabolitos tóxicos, pero ahora se sabe que son parte de un complejo sistema de señalización⁹⁴. Muchas enzimas en mitocondria, retículo endoplásmico, peroxisomas y otros compartimentos celulares están involucrados en la producción de ROS^{95,96}, lo que genera estrés oxidativo ya sea a través de la interacción directa con las moléculas biológicas como las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos o a través de la activación de cascadas de señalización relacionadas a la respuesta al estrés, incluyendo proteína kinasas, citosinas y factores de transcripción⁹⁴, llevando al desarrollo de el proceso inflamatorio.

Mediciones directas en tejido hepático en pacientes con hepatitis C crónica han mostrado un incremento en la concentración de ROS⁹⁷. Tal incremento significativo también fue descrito en linfocitos de pacientes con infección crónica y oculta con VHC⁹⁸.

El glutatión representa uno de los mayores antioxidantes, se sintetiza en todos los tipos de organismos eucarióticas y se encuentra concentrado en el

hígado⁹⁹. Una gran cantidad de pacientes con hepatitis C crónica han manifestado niveles reducidos de glutatión y otros antioxidantes, así como una disminución en la actividad, tanto en muestras de sangre como en biopsias hepáticas^{98,100-108}. Además de la reducción a los niveles de glutatión total, el estrés oxidativo inducido por el VHC se ve acompañado por un incremento en la tasa de sus formas oxidadas (GSSG) y reducidas (GSH). Los pacientes con CHC muestran bajas en los niveles de enzimas de defensa antioxidante como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa y glutatión peroxidasa^{103,109,110}, aunque también se han reportado incrementos¹¹¹. De manera interesante, se ha observado que la expresión de dichas enzimas no se ve alterada en el hígado de pacientes infectados, lo que sugiere que la alteración en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) puede ser un evento secundario¹¹¹. Los pacientes también muestran un incremento en la expresión de otras enzimas de defensa antioxidante, incluyendo la tiorredoxina (Trx)^{112,113} o la hemo oxigenasa (HO-1)¹⁰⁸.

1.6.1 Proteínas virales asociadas con estrés oxidativo

El VHC se replica en citoplasma lo que da como resultado la infección crónica, la extensión del daño mitocondrial y la magnitud de la lesión oxidativa en el tejido hepático. La proteína viral de nucleocápside del VHC ha sido implicada en el incremento de estrés oxidativo en el hígado¹¹⁴. De las 10 proteínas virales. La proteína core es la que ha probado ser el regulador mas fuerte^{115,116} pero no es la única que se ha asociado con el estrés oxidativo, las

proteínas NS3 y NS5A también se han visto involucradas en el incremento de este¹¹⁷⁻¹¹⁹. Las proteínas E1¹¹⁵, E2^{120,121} y la NS4B también se han relacionado a la presencia de estrés oxidativo.

La proteína no estructural 5A, una proteína integral para la replicación del virus así como para otros fenómenos como la resistencia al interferón y apoptosis¹²², cambia los niveles de calcio. Las proteínas core, NS5A y NS3 no solo incrementan la captación de calcio por la mitocondria, sino que también provocan oxidación del glutatión mitocondrial, incrementando las ROS¹²³⁻¹²⁵, resultando en la translocación al núcleo de Nf-κB y transcripción de STAT-3^{126,127}. La NS4B también incrementa dicha translocación de NF-κB a través de la fosforilación de la proteína tirosina kinasa (PTK) y degradación subsecuente de κB alfa¹²⁸. La proteína NS5A se ha visto involucrada de manera importante en la activación de p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) y AP-1 (activator protein-1) que están relacionadas al incremento del estrés oxidativo, incrementando los sistemas antioxidantes de MnSOD¹²⁹. De la mano con las ROS, el óxido nítrico (NO) causa daño al DNA. El NO no sólo daña el DNA, sino que también inhibe la reparación del mismo¹³⁰⁻¹³². La caseína kinasa 2 y la fosfoinositol kinasa 3 median el efecto de las proteínas core y NS5A¹¹⁵.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 Acido acetil salicílico (AAS) y VHC

El AAS, ingrediente de la aspirina, es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo (AINEs), que es conocido y utilizado de manera global. La aspirina no sólo reduce el riesgo de infarto al miocardio, sino que podría convertirse en una promesa contra el cáncer de colon, debido a que parece estar involucrada en los procesos de angiogénesis. Al iniciarse un proceso inflamatorio, la enzima fosfolipasa actúa sobre las membranas de las células liberando ácido araquidónico. Sobre éste actúan dos enzimas, la ciclo-oxigenasa (COX) y la lipo-oxigenasa que son responsables de la producción de prostaglandinas (PGE₂), hidroxiperóxidos y leucotrienos. El mecanismo de acción del AAS consiste en bloquear la actividad de ambas isoformas de ciclo-oxigenasa (COX-1 y COX-2) al acetilar su sitio activo en el residuo serina 530. Esto ocasiona una disminución en la síntesis de PGE₂, que son responsables de producir dolor, fiebre e inflamación. Existen antecedentes *in vitro* de que el AAS disminuye la carga viral de algunos *flavivirus*, tales como el virus del dengue y el virus de encefalitis japonesa, familia a la que también pertenece el VHC ¹³³.

Como producto de una colaboración científica con el Dr. Antonis Koromilas (Lady Davies Institute, Mc Gill University, Canadá) en nuestro laboratorio contamos con el sistema *in vitro* de replicones subgenómicos del

VHC. Con el empleo de este sistema hemos obtenido resultados que demuestran que la aspirina regula negativamente la replicación y expresión génica del VHC. Efecto que parece ser modulado por un intermediario de la vía del estrés oxidativo conocido como COX-2 ¹³⁴. También hemos encontrado que la aspirina presenta propiedades antioxidantes al disminuir los niveles de proteínas y lípidos oxidados tanto en las células parentales (no expresan las proteínas no estructurales virales) como en las células replicón. Así mismo se observó que la aspirina aumentó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD; enzima antioxidante), pero no la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx). A continuación se describen los resultados obtenidos.

2.2 Inhibición de la replicación y expresión génica del VHC inducido por AAS

Nuestros resultados muestran que el AAS a una concentración de 4 mM disminuyó hasta un 58% los niveles del RNA viral con respecto a las células Huh7 replicón que no fueron expuestas a AAS. Además, este efecto fue directamente proporcional al tiempo de exposición siendo más evidente a las 72 horas post-tratamiento (** $P < 0.01$) (figura 6).

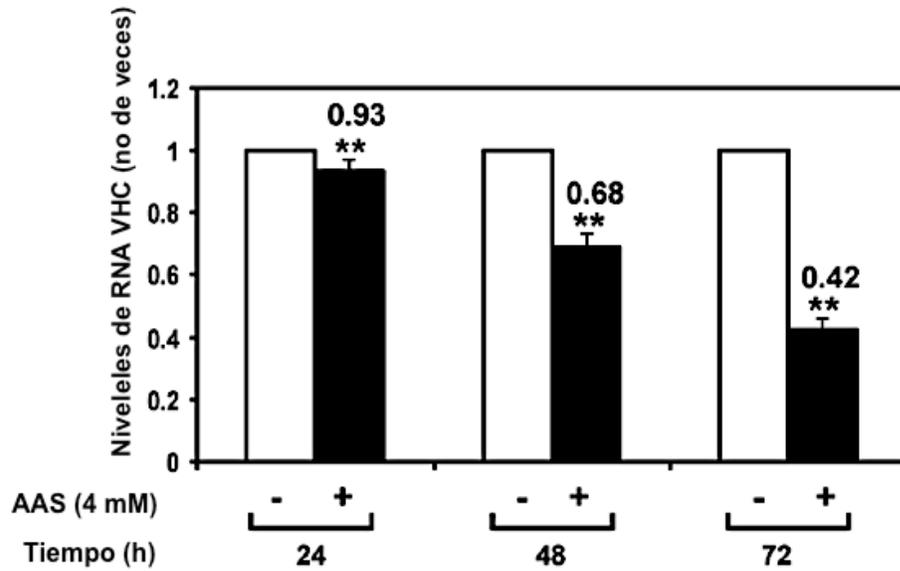


Figura 6. Efecto del AAS en los niveles del RNA viral. Resultados de la PCR cuantitativa en Tiempo Real (P < 0.01). Cada ensayo se realizó por triplicado. Para normalizar nuestros resultados de PCR se cuantificó la expresión del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH)¹³⁴.**

El AAS también disminuyó los niveles de las proteínas virales de manera directamente proporcional al tiempo de exposición, ya que la proteína viral NS5A disminuyó hasta un 68% comparada con el control sin tratamiento (figura 7).

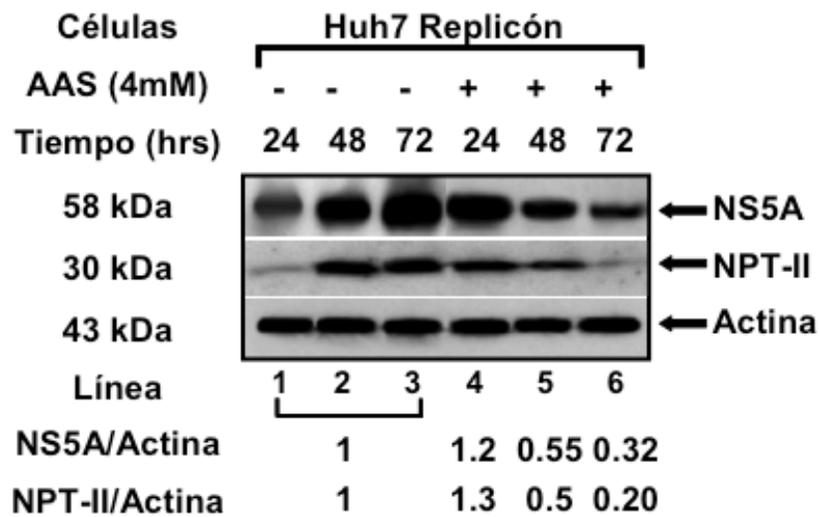


Figura 7. Efecto del AAS en los niveles las proteínas virales¹³⁴.

Interesantemente se observó mediante ensayos de western blot que los niveles de la proteína celular COX-2 disminuyeron cuando las células que contienen el replicón del VHC fueron expuestas a AAS (figura 8). Además, se observó que el AAS disminuyó los niveles del mRNA de COX-2 (manuscrito en preparación), lo que sugiere fuertemente que el efecto negativo del AAS en la expresión génica del VHC puede estar mediado por la enzima COX-2¹³⁴.

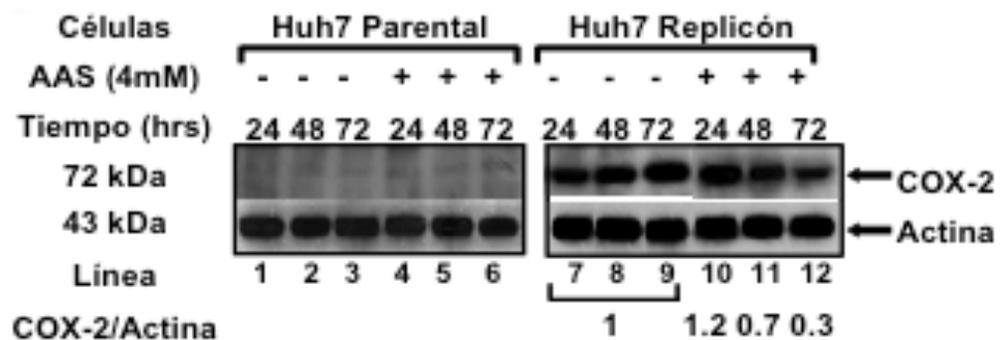


Figura 8 . El AAS disminuye los niveles de la proteína COX-2¹³⁴.

2.3 Participación del estrés oxidativo

El comportamiento antes descrito es una incógnita para la cual aún no se tiene respuesta, pero está quizás se encuentra dentro de los procesos relacionados al estrés oxidativo. Los radicales libres, conocidos como especies reactivas de oxígeno ROS, se han vuelto de gran interés a nivel médico-social. Las ROS son producto normal del metabolismo celular y son mantenidas dentro de niveles fisiológicos por medio de sistemas antioxidantes propios de la célula [superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx)], aunque también es necesaria la presencia de compuestos antioxidantes en la dieta. Inicialmente las ROS se relacionaban a daños celulares tales como: peroxidación lipídica (daño a las membranas, aterosclerosis), oxidación de proteínas (pérdida de función enzimática) y a mutaciones (daño al DNA). Sin embargo, en los últimos años se ha asociado la participación de las ROS con diferentes vías de señalización celular.

Existen antecedentes que proponen una inducción del estrés del RE por aumento del tráfico de colesterol y por inhibición de la glicosilación de proteínas en células que mantienen la replicación del VHC^{135,136}. También, se ha reportado que en células en las cuales tiene lugar la replicación del VHC, los niveles de ROS son hasta 5 veces más elevados que las células control¹³⁷. Sin embargo, aún no se ha demostrado una asociación directa entre los mecanismos de replicación de este virus y la participación del estrés oxidativo presente en las células infectadas. Con base a lo anterior, se evaluó la

participación del estrés oxidativo en la inhibición de la replicación del VHC inducida por el AAS *in vitro*. Se encontró que la aspirina presentó propiedades antioxidantes al disminuir los niveles de proteínas y lípidos oxidados, tanto en las células parentales (no expresan las proteínas no estructurales virales), como en las células replicón (figuras 9 y 10).

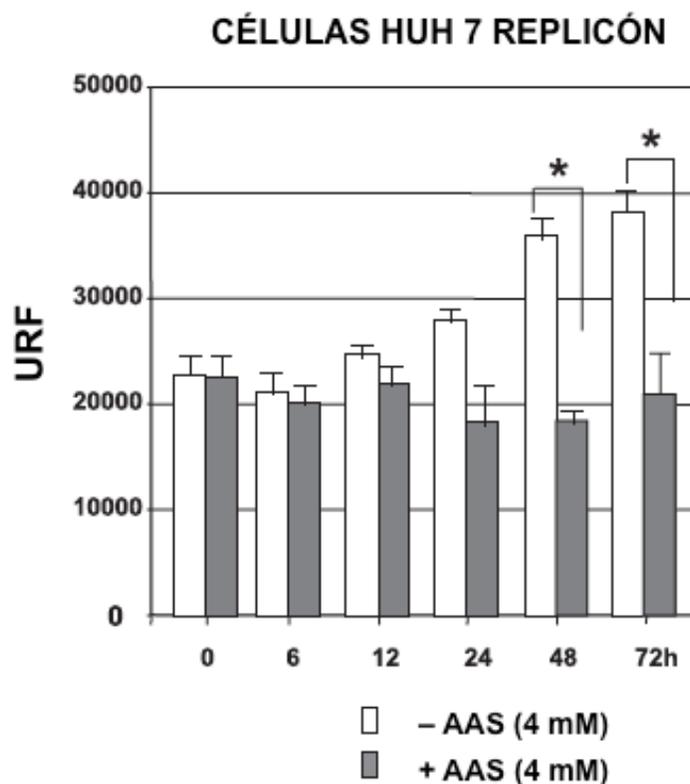


Figura 9. El AAS disminuye los niveles de proteínas oxidadas en las células Huh7 replicón¹³⁸. Las células fueron incubadas en presencia y ausencia de AAS 4mM a diferentes tiempos (0–72 h). Al final de la incubación se prepararon lisados celulares y se cuantificó por oxiblot los niveles de proteínas oxidadas.

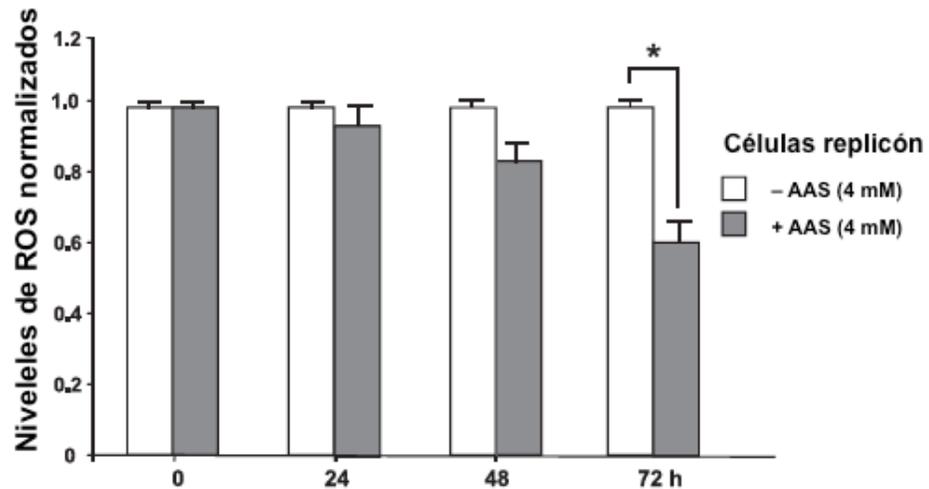


Figura 10. El AAS disminuye los niveles de lípidos oxidados en las células Huh7 replicón¹³⁸. Las células fueron incubadas en presencia y ausencia de AAS 4mM a diferentes tiempos (0–72 h). Al final de la incubación se midieron los niveles de ROS por el ensayo de fluorescencia método de la 2',7' –diclorofluoresceína.

También se observó que la aspirina aumentó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD; enzima antioxidante) (figura 11), pero no la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx) (figura 12). La enzima SOD es una enzima antioxidante que protege a las células del estrés oxidativo al catalizar la disminución de aniones superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2)¹³⁹. Mientras que la enzima GPx cataliza la conversión de H_2O_2 a agua. Estos resultados sugieren que el efecto antiviral de la aspirina podría estar mediado por su efecto antioxidante. Sin embargo, todavía resulta difícil de precisar el (los) mecanismo(s) mediante el cual la aspirina disminuye los niveles del RNA y proteínas virales, y modifica los niveles del estrés oxidativo. Con base en estos antecedentes, en este proyecto nos

propusimos evaluar la participación de la enzima SOD en la inhibición de la replicación del VHC inducida por aspirina.

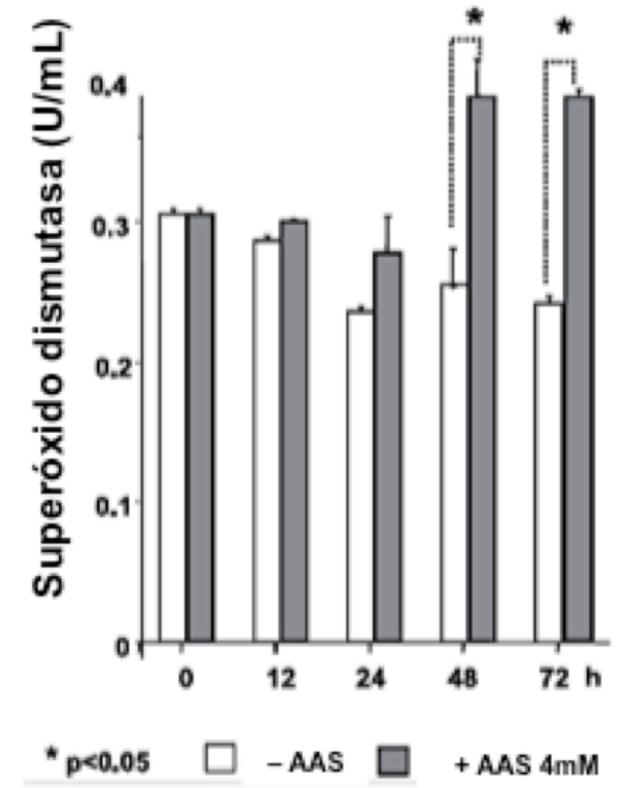


Figura 11. El AAS aumenta la actividad de la enzima SOD en las células Huh7 replicación¹³⁸.

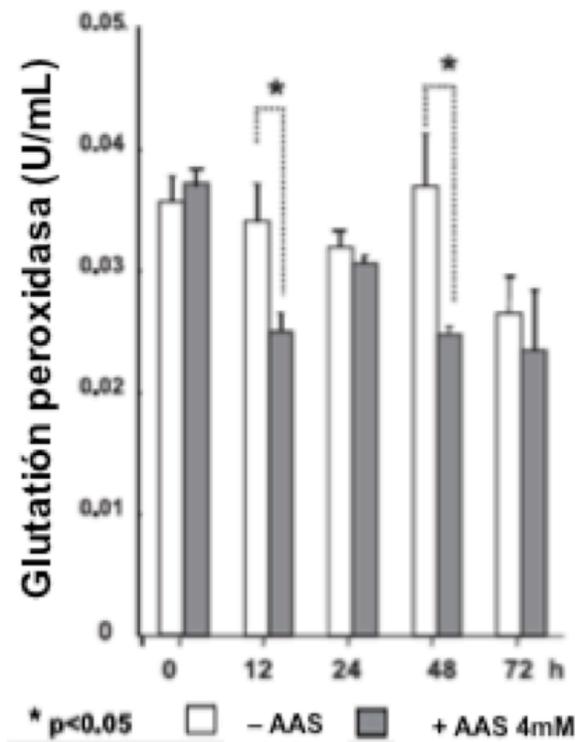


Figura 12. El AAS disminuye la actividad de la enzima GPx en las células Huh7 replicación¹³⁸.

2.4 Superóxido dismutasa (SOD) y VHC

En los seres humanos existen tres formas de superóxido dismutasa. SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular. La primera es un dímero, mientras que las otras son tetrameros. SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo. Hay disponibles placas para ensayos de micro titulación de SOD¹⁴⁰. El ión superóxido es una de las principales ROS en la célula y la SOD tiene un papel fundamental como antioxidante.

Fisiológicamente, la importancia de la SOD es ilustrada por las severas patologías que se evidencian en ratones genéticamente modificados para que carezcan de esta enzima, estos ratones mueren a los pocos días de nacer por estrés oxidativo masivo¹⁴¹; sin SOD1 desarrollan una gran variedad de patologías, incluyendo hepatocarcinoma, una acelerada pérdida de masa muscular relacionada con la edad¹⁴², una temprana incidencia de cataratas y una esperanza de vida reducida; con la ausencia de SOD3 no muestran deficiencias obvias y tienen una esperanza de vida normal¹⁴³.

El estrés oxidativo se ha detectado en casi todas las condiciones experimentales o clínicas de las enfermedades hepáticas crónicas. Görenek en el 2006, realizó un estudio en el cual se midieron diversos marcadores de estrés oxidativo en pacientes infectados con el VHC. Sus resultados muestran que los niveles de SOD están significativamente reducidos en pacientes con hepatitis crónica antes del tratamiento, en comparación con pacientes sanos ($p < 0.001$), este resultado puede indicar una disminución en la capacidad antioxidante de los pacientes infectados con VHC. La reducción de SOD y glutatión peroxidasa (GPx) refleja una disminución en la capacidad de la síntesis hepática y el poder antioxidante, en pacientes con VHC, esto puede deberse al incremento en la oxidación de lípidos, causado por la inflamación, debido a la infección viral, y esto podría considerarse como un marcador temprano de estrés oxidativo. También se observó que los pacientes infectados se recuperan en sus marcadores de estrés oxidativo (los cuales están significativamente aumentados) posterior al tratamiento con IFN y ribavirina (figura 13)¹⁰⁹.

Concentración de MDA, SOD, GSH-Px y ALT, AST en pacientes con hepatitis C crónica antes y después de tratamiento. (Media \pm Desviación estándar)

	Pacientes Hepatitis C crónica pre-tratamiento	Pacientes Hepatitis C crónica pre-tratamiento	Valor P
MDA	9,28 \pm 1,61	4,88 \pm 1,22	<0.001
CuZn-SOD	213,84 \pm 71,61	357,94 \pm 82,10	<0.001
GSH-Px	6,52 \pm 1,86	9,47 \pm 1,82	<0.001
ALT	95,84 \pm 22,68	26,73 \pm 10,65	<0.001
AST	80,52 \pm 19,27	25,52 \pm 8,68	<0.001

Los valores se muestran como medias, los valores de p (<0.05) se obtuvieron de una prueba T pareada simple de muestras independientes. Las unidades se expresan de la manera siguiente: MDA nmol/mL; CuZn-SOD U/mL; GSH-Px U/mL; ALT, AST U/L.

Figura 13. Niveles de marcadores de estrés oxidativo en pacientes infectados con VHC modificada de¹⁰⁹.

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

La importancia médica en México de la infección por el VHC ha crecido debido a que esta enfermedad puede complicarse con la posibilidad de desarrollar cirrosis hepática, patología que representa la quinta causa de muerte en la población mexicana. Resultados obtenidos en el laboratorio demuestran que la aspirina regula negativamente la replicación y expresión génica del VHC; efecto que parece estar modulado en parte por un intermediario de la vía del estrés oxidativo conocido como Ciclooxygenasa-2 (COX-2). También se encontró que la aspirina presenta propiedades antioxidantes al disminuir los niveles de proteínas y lípidos oxidados, tanto en las células Huh-7 parentales, como en las células Huh-7 con el replicón subgenómico. Así mismo, se observó que la aspirina aumentó la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD; enzima antioxidante), pero no la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx). Con base a lo anterior, es de suma importancia conocer los mecanismos moleculares que modulan la replicación e inhibición del VHC en las células infectadas. Los resultados de este proyecto permitirán aportar hallazgos sobre los mecanismos moleculares que participan en la regulación de la replicación del VHC; así mismo, permitirán la identificación de potenciales blancos terapéuticos para combatir y erradicar la infección por el VHC, y de esta forma crear nuevas expectativas para la profilaxis y el tratamiento de los pacientes con hepatitis C.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la participación de la enzima SOD1 en la expresión génica e inhibición de la replicación del VHC.

4.2 Objetivos específicos

1. Implementación del cultivo celular para la producción de partículas virales infecciosas del VHC en células Huh7.5.1 y el sistema biológico de infección.
2. Evaluar los niveles de expresión de SOD1 en células de hepatoma en presencia y ausencia de partículas infecciosas del VHC y un efector positivo de la enzima.
3. Silenciar (Knock-down) mediante la tecnología de RNA de interferencia (RNAi) la expresión de la enzima SOD1 y evaluar su efecto en la regulación de la replicación y expresión génica del VHC.
4. Construir el plásmido que exprese la enzima SOD1 y evaluar el efecto de la sobreexpresión transitoria de la enzima SOD1 en la regulación de: la replicación y expresión génica del VHC, sistemas

antioxidantes y los niveles de estrés oxidativo presentes en la línea celular de hepatocitos infectados con el VHC.

4.3 Estrategia general

En el presente proyecto de investigación se planteo la siguiente estrategia experimental, que consistió de la siguientes actividades generales (figura 14). Generar las partículas virales del VHC en hepatocitos, posteriormente realizar ensayos de infección para estandarizar las condiciones experimentales. Utilizando el sistema de infección evaluar los niveles de expresión (RNA y proteína) de diversas enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, CAT y GPx) y determinar si hay modulación diferencial en algún isotipo de SOD. Una vez observado que SOD1 está disminuida, utilizar el sistema de replicón subgenómico para silenciar el gen y observar su efecto en la replicación del VHC. Por otra parte construir un vector de expresión para SOD1 y realizar ensayos de sobre-expresión transitoria para observar el efecto en la replicación del virus.

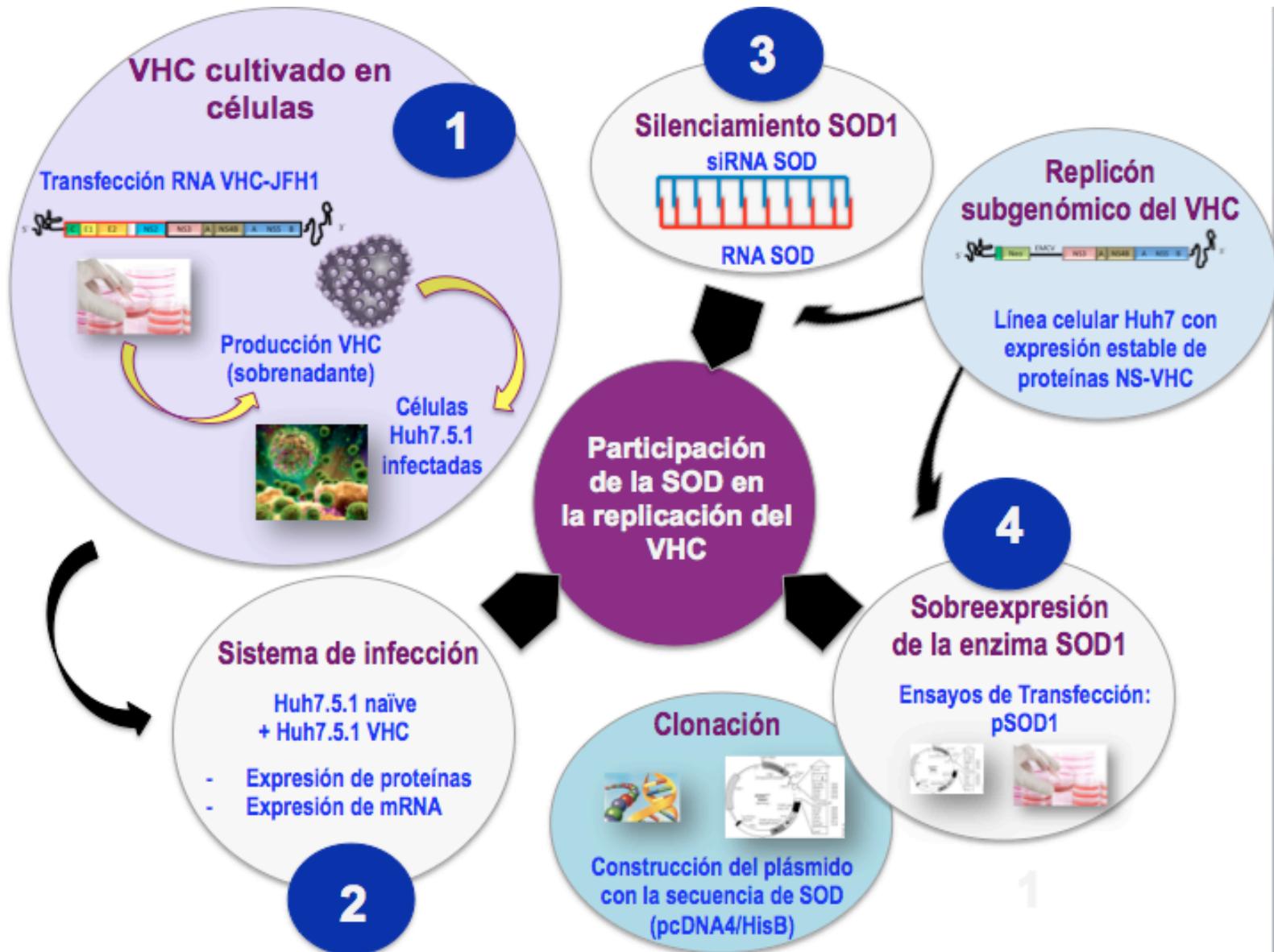


Figura 14. Estrategia experimental

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Laboratorio de Medicina Experimental del Instituto Lady Davies del Hospital General Judío-Universidad de McGill, Canadá.

5.1 Cultivo celular

La línea celular de hepatocarcinoma humano Huh7 que expresa constitutivamente el plásmido PFK₃₈₁-1-NS3-3' (replicón subgenómico del VHC, genotipo 1b) y Huh7.5.1 una línea celular derivada de la línea Huh7 que es altamente permisiva a la replicación del VHC, fueron cultivadas en medio A-DMEM (del inglés, Advanced-Dulbecco's Modified Eagle's Media, Gibco) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB), 1% aminoácidos no esenciales, 1% glutamina y 1% de antibióticos (penicilina, estreptomina. En una Incubadora a 37 °C con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 3 días. Estas fueron las condiciones regulares de cultivo, a menos que se indique otra condición.

5.2 Clonación del plásmido JFH1

Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α (NEB) calcio competentes, se descongelaron 100 μ L de bacterias en hielo por 10 min con y se añadió cuidadosamente 10 μ L (0.1 μ g) del plásmido JFH1 el cual contiene la secuencia del genoma completo del VHC, genotipo 2A, el plásmido fue amablemente proporcionado por el Dr. Kostas Pantopoulos (Lady Davis Institute, Jewish General Hospital, McGill University, Canadá), se mezcló cuidadosamente, invirtiendo el tubo 4-5 veces. Se mantuvo en reposo la mezcla durante 30 min. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 90 s sin agitar, posteriormente se incubó 10 min en hielo. Se agregaron 100 μ L de medio LB (US Biological, EUA) y se incubaron a 37°C por 1 h a 250 rpm. Se tomaron 50-250 μ L para sembrar en placas con LB-ampicilina (Sigma Aldrich, EUA), previamente calentadas a 37°C. Se cultivaron las placas a 37°C durante 12 h. Las clonas seleccionadas se crecieron de acuerdo a las indicaciones del kit MAXIPrep (Qiagen, EUA), para la obtención de más plásmido. El plásmido se digirió con las enzimas *Xba*I, *Hind*III y *Kpn*I (NEB, EUA) para su caracterización.

5.3 Producción de partículas virales del VHC

Se digirió el plásmido JFH1 con la enzima *Xba*I (high concentration) (Cat. R0145M, NEB) para linearizar el plásmido y se purificó el DNA. Posteriormente se digirió con la endonucleasa *Mungbean nuclease* (Cat. M02505, NEB, EUA),

para evitar la recircularización del mismo y purificar el DNA . Una vez listo el templado, se utilizó el kit MEGAScript (Cat 1334, Ambion, EUA), para la síntesis de RNA *in vitro*. Se realizó la extracción de RNA por el método de TRIzol LS (Invitrogene, EUA). El RNA obtenido se utilizó en los experimentos de transfección. Se sembraron 700, 000 células Huh7.5.1 en placas de 6 cm con medio ADMEM suplementado, al día siguiente se removió el medio y se lavó con medio OptiMEM (Gibco, EUA) y se preparó la mezcla de transfección (4 μ L OptiMEM + 40 μ L DMRIE-C (cat. 10459-014, Invitrogen, EUA) + 10 μ g RNA-JFH1 *para dos placas), se añadieron 2 mL de mezcla por placa y se incubaron por 4h, después se lavó con medio regular y se crecieron por alrededor de 30 días. Se colectó RNA total y proteína total a diferentes tiempos para detectar la expresión del virus. Se colectó el sobrenadante de las células transfectadas. Para los ensayos de infección se sembraron 400, 000 células Huh7.5.1 en medio ADMEM suplementado, al día siguiente se cambió el medio por sobrenadante infeccioso y se incubó por 1 día. Transcurrido el tiempo se cambió a medio ADMEM y se cultivaron las células cuando estaban al 80%. Es importante considerar la cantidad de células que se utilizaran en los experimentos utilizando el sistema de infección, para determinar la cantidad de placas que se infectaran al inicio.

5.4 Extracción de RNA

La extracción RNA total a partir de cultivo celular se realizó raspando las células con PBS frío y se realizó bajo las condiciones del fabricante, empleando el reactivo TRIzol (marca Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), cloroformo (marca Fischer Scientific, New Jersey, USA), Etanol (marca Merck, Darmstadt, Alemania), isopropanol (marca Fischer Scientific, New Jersey, USA) e inhibidor de RNAsas 'RNA out' de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura tratada con el inhibidor de RNAsas Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma Aldrich, EUA).

5.5 Retrotranscripción

Para la síntesis del DNA complementario a partir de RNA total se siguieron las indicaciones del fabricante y se utilizó la enzima RT-MMLV, Buffer RT 5X, Random primers, Ditiotreitól (DTT), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e inhibidor de RNAsas 'RNA out', todos de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

5.6 PCR cuantitativa

La cuantificación relativa del mRNA de los dos isotipos de SOD, la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT), NS3 y NS5A, y del mRNA del gen Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se realizó en dos

etapas. Primero, se sintetizó el cDNA utilizando la enzima RT-MMLV, antes descrito. Para el análisis de la expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se utilizó el reactivo SYBR Green ER qPCR Supermix for ABI de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), utilizando los iniciadores para cada gen (**Tabla 4**).

Tabla 4. Secuencias de oligos utilizados para qPCR

Gen	Iniciador 5' – 3'	Iniciador 3' – 5'
SOD1	AGGGCATCATCAATTTGAG	TGCCTCTCTTCATCCTTTGG
SOD2	GGAACGGGGACACTTACAAA	GGTAGTAAGCGTGCTCCCAC
GPx	CAACCAGTTTGGGCATCAG	CCCACCAGGAACTTCTCAA
CAT	TAAGACTGACCAGGGCATC	CAAACCTTGGTGAGATCGAA

La normalización de los datos se realizó definiendo como gen endógeno la proteína ribosomal s18 o la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (**GAPDH**) y utilizando el estuche comercial Human GAPDH 20X y el TaqMan Universal PCR Master Mix, ambos de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$ para los cálculos de expresión. Cada condición se realizó por triplicado.

5.7 Western blot

Las células fueron raspadas con ayuda de un gendarme de goma, se utilizó PBS 1X frío para lavar las células, posteriormente se centrifugaron 15 s a máxima velocidad, se removió el PBS y se extrajo la proteína total con el buffer de lisis 1X en una relación volumen 1:1, el lisado se incubó a 20 min en hielo y se centrifuga a 13,000 rpm/10 min, se separa el sobrenadante y se almacena a -80°C. Se cuantifica la concentración de proteínas por Bradford, usando una curva estándar. Se cargaron 50 µg de proteína total por pozo, se corre a 100V por 2h en un gel de poliacrilamida 12% o 14% (PAGE-SDS), se transfiere a una membrana de PVDF a 400 mA por 90 min, la membrana se bloquea con TBS-tween 0.1% por 60 min, se incubó con el anticuerpo primario toda la noche, al día siguiente se dan 3 lavados de 10 min c/u con TBS-tween 0.1%, y se incubó con el anticuerpo secundario por 90 min, la membrana se vuelve a lavar con TBS-tween 0.1% , 3 lavados de 10 min c/u. Se detecta la proteína por quimioluminiscencia (ImmunoCruz western blotting luminol reagent, Santa Cruz, cat #sc-2048, EUA). Para la captura de imagen se utiliza el fotodocumentador Chemidoc XRS (Bio-Rad, Alemania). El análisis densitométrico se realizó mediante el software ImageJ (NIH). Se utilizaron los anticuerpos primarios: anti-SOD1 (Santa Cruz sc-11407, EUA), anti-SOD2 (Santa Cruz, sc-18504, EUA), anti-HCV core (Affinity BioReagents, MA1-080. EUA), anti-HCV NS3 (Abcam, ab65407, EUA), anti-HCV NS5a (Bioss, C65388M, EUA) y los anticuerpos secundarios: anti-conejo (Santa Cruz, sc-217, EUA), anti-ratón (Promega, W4021, EUA) y anti-cabra (Santa Cruz, sc-2354, EUA).

5.8 Tratamiento con AAS

Las células Huh-7.5.1 nativas y las células Huh-7.5.1 infectadas VHC fueron sembradas (500,000 células), 1 día después se realizó el cambio de medio y fueron incubadas en presencia o ausencia de AAS 4 mM durante 24, 48 y 72 h. Cada condición se realizó por triplicado.

5.9 Bloqueo de la expresión de la SOD1 utilizando la tecnología del RNA de interferencia

Se sembraron 1.5×10^5 células Huh-7 replicón en placas de seis pozos, cultivadas en medio A-DMEM suplementado con 2% de SBF, 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina G y 100 µg/mL de estreptomycin. Cuando las células tenían un 30-50% de confluencia se transfectaron con el iRNA para silenciar la expresión de la SOD1 utilizando el kit de transfección siPORT Lipid de la marca Ambion (Austin, TX, USA). Como controles negativos se utilizó un iRNA non-sense (Ambion #AM4611) y células no transfectadas. Las células fueron incubadas por 24, 48 y 72 h, luego se cosecharon y se hizo la extracción de RNA y proteínas totales que serán analizadas por qPCR.

5.10 Clonación del gen SOD1

Se utilizó el plásmido pcDNA4 his B (Invitrogene, EUA) para clonar y expresar el gen de la SOD1. Para generar el vector se diseñaron los iniciadores específicos para amplificar el ORF completo a partir del cDNA obtenido del RNA extraído de las células Huh7, oligo sentido SOD 5`ATA TTA ATG GAT CCT ATG GCG ACG AAG GCC GTG TGC 3` y oligo antisentido SOD 5`AAT ATA TAT GCG GCC GCA TTA TTG GGC GAT CCC AAT TAC ACC 3`, con sitios *Bam HI / Not I* (NEB, EUA). El cual fue secuenciado con el kit comercial BIG DYE v1.1/v3.1 (Applied biosystems, EUA). Las condiciones de reacción son las siguientes: 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C por 4 minutos, con la finalidad de corroborar que la secuencia sea correcta. Posteriormente se realizaron ensayos de Maxi-prep (Qiagen, EUA) para propagar a mediana escala el plásmido y purificarlo para ser utilizado en los ensayos de transfección.

5.11 Ensayos de transfección transitoria

Un día antes de la transfección se sembraron 200,000 Huh7 replicón en placas de 6 pozos. Al siguiente día las células son infectadas durante una hora con el virus *vaccinia* recombinante (que expresa a la T7 RNA polimerasa), seguido de la transfección con el plásmido que expresa el gen de la SOD1 bajo el control del promotor de la T7, a diferentes concentraciones de DNA. Las células se incubaron con medio sin suero a 37°C por 4 horas, seguido de la

adición de medio con suero e incubadas por un tiempo adicional de 36 h horas. Posteriormente, las células fueron cosechadas para evaluar la expresión por western blot y qPCR.

5.12 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y las variables fueron analizadas por la prueba T de Student y se realizó utilizando el software estadístico SPSS (versión 15.0). Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p \leq 0.05$.

CAPITULO VI

RESULTADOS

6.1 Implementación del sistema de infección y cultivo celular para la producción de partículas virales infecciosas del VHC en células Huh7.5.1

6.1.1 Clonación y caracterización del plásmido pJFH1

Se realizó la clonación del plásmido pJFH-1 en bacterias *E. coli* DH5 α . Después de la transformación, las bacterias se crecieron en medio LB/Amp y se seleccionaron las clonas resistentes para extraer el DNA plasmídico (MINI-PREP, Qiagen). Posteriormente las colonias se sometieron a digestión con enzimas de restricción (*Hind*III, *Kpn*I, y *Xba*I) (figura 15). De las transformaciones exitosas con el patrón esperado se seleccionó una clona y se creció a mayor volumen (200ml) en medio LB/Amp para producir el plásmido a gran escala, se realizó extracción y purificación de DNA plasmídico (MAXI-PREP, Qiagen) y se caracterizó (figura 16)

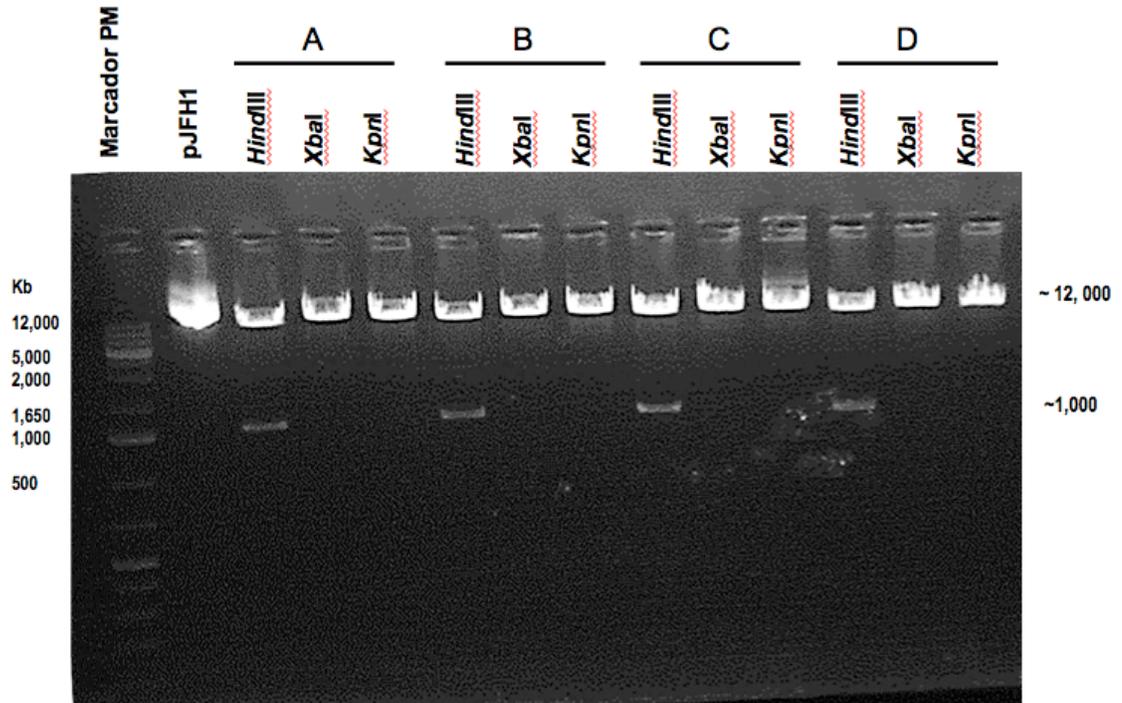


Figura 15. Caracterización del plásmido pJFH1. Electroforesis del DNA digerido *HindIII*, *KpnI*, y *XbaI* (gel de agarosa 1%). Las clonas presentaron el patrón de digestión esperado, se observan dos bandas una superior a 12,000 pb y otra alrededor de 1,000 pb

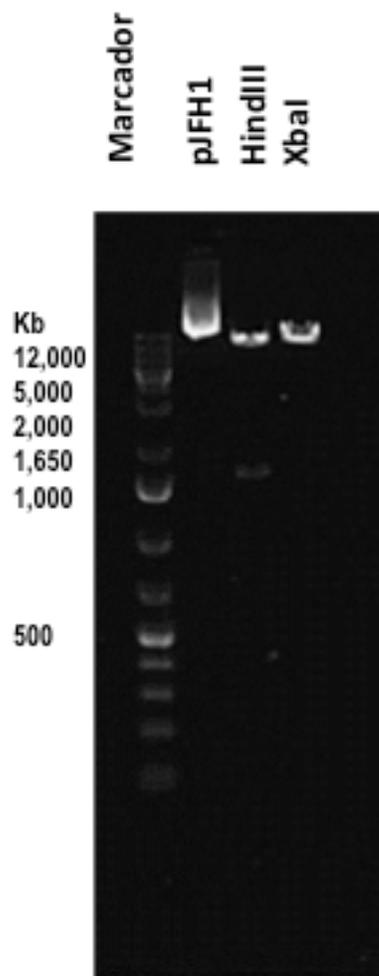


Figura 16. Purificación del plásmido pJFH1. Electroforesis del DNA digerido *HindIII*, y *XbaI* (gel de agarosa 1%). Se observan dos fragmentos que corresponden a la digestión con *HindIII* y una banda sólida que representa al DNA linearizado por *XbaI*.

6.1.2 Transcripción *in vitro* del pJFH1

El plásmido pJFH-1 se linearizó utilizando la enzima de restricción *XbaI* y posteriormente se incubó con la nucleasa *Mung bean*, para evitar que la recircularización de la secuencia correspondiente al virus (figura 17).

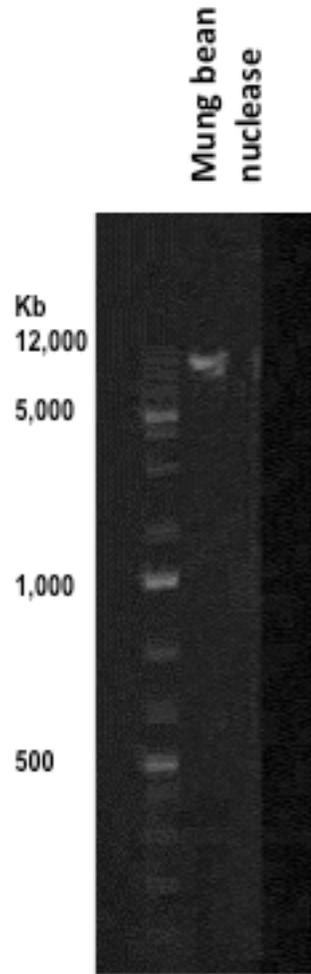


Figura 17. Plásmido pJFH1 linearizado. Electroforesis del DNA digerido con la endonucleasa *Mung bean* (gel de agarosa 1%). Se observa una banda por encima de los 12,000 pb correspondiente al DNA linearizado integro.

Posterior a la digestión, el pJFH-1 se transcribió mediante el kit MEGAscript, y se realizó la extracción de RNA total con TRIzol. La calidad del RNA obtenido fue evaluada, se verificó la integridad en gel de agarosa-MOPS (figura 18) y la pureza, al espectrofotómetro tuvo una DO (A_{260}/A_{280})= 1.9.

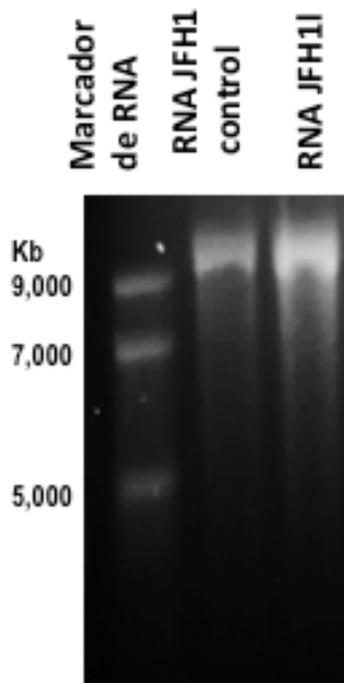


Figura 18. RNA del VHC-JFH1. Electroforesis del RNA transcrito *in vitro* (gel de agarosa 1%, MOPS). Se observa que el RNA extraído está por encima de las 9,000pb y que tiene una gran calidad al ser una banda bien definida.

6.1.3 Transfección del RNA JFH-1.

Con 5µg de RNA VHC-JFH-1 se transfectaron células Huh7.5.1. Las células fueron cultivadas cada 3 días y se colectaron muestras por un periodo de 30 días. La transfección fue exitosa ya que se detectó la presencia de proteínas estructurales (core) y no estructurales (NS3) del virus desde el día 15 post-transfección, teniendo la mayor expresión a los días 24 y 26 post-transfección. A los días 28 y 30 la expresión de la proteína NS3 disminuyó y la proteína core ya no se detectó (figura 19). Se colectó el sobrenadante celular correspondiente a los días 24 y 26, que presentaron la mayor expresión de proteínas del virus.

Por lo tanto, la posibilidad de que este tuviera partículas virales era alta, por lo que se utilizó para posteriores ensayos de infección.

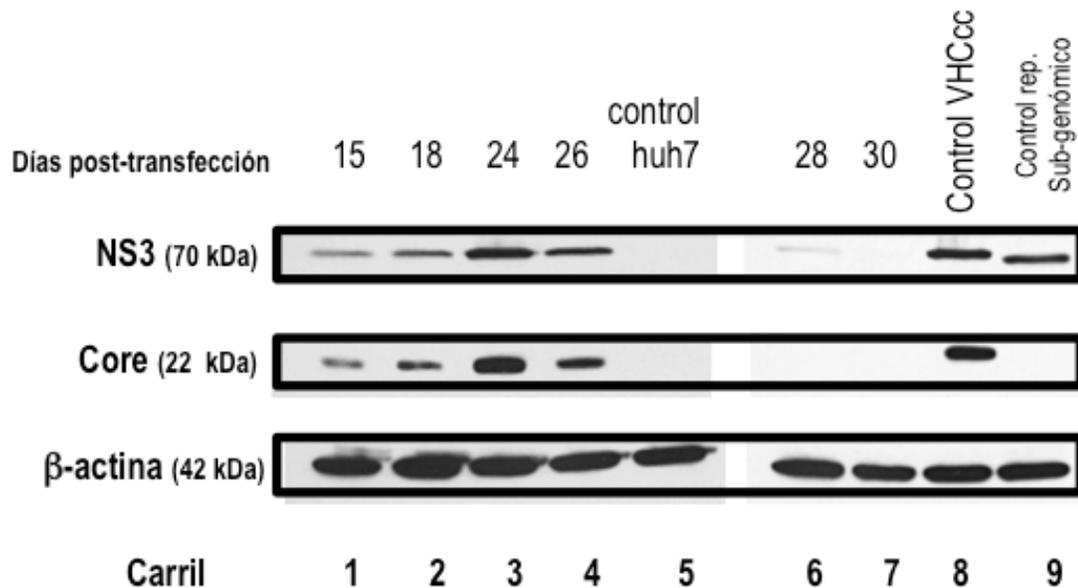


Figura 19. Ensayo de transfección de células Huh7.5.1. Expresión de las proteínas core y NS3 del VHC. Western blot. Se observa el aumento de la intensidad en la expresión de las proteínas virales a través de los días de cultivo, alcanzando el nivel máximo al día 24 para la proteína NS3 y core.

6.1.4 Ensayos de infección con partículas del VHC JFH1.

Las células fueron cultivadas cada 3 días y se colectaron células para extracción de RNA y proteínas totales para detectar la presencia del virus. Por qPCR se detectó la replicación de RNA viral desde el día 3 post-infección (figura 20), el cDNA de las células colectadas al día 6 post-infección fue amplificado siendo evidente a un Ct menor.

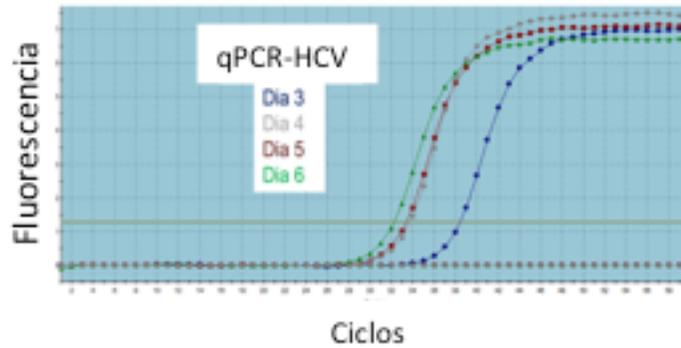


Figura 20. Expresión del RNA del VHC. Gráfico representativo de qPCR para NS3. Se observa que a los días 6 y 5 post-transfección hay Ct's más bajos, confirmando la expresión de genes virales a tiempos cortos.

El sobrenadante que se colectó al día 24 (post-transfección) probó ser infeccioso, ya que se logró la detección de la expresión de la proteína NS3 desde el día 1 post-infección y la proteína core a partir del día 4 post-infección. El incremento en la expresión de proteínas virales fue proporcional al tiempo, ya que en los días 11-14 post-infección la expresión de proteínas virales (NS3 y core) incrementó (figura 21). Esto demuestra que la capacidad de cultivar al virus en células es más eficiente si se utilizan partículas infecciosas, comparado con la transfección del RNA (JFH1) viral. Este resultado permitió establecer las condiciones para futuros experimentos, tomando en cuenta los tiempos en los cuales se puede evaluar a los sistemas antioxidantes en la célula cuando están presente las proteínas estructurales y proteínas no estructurales. Estas últimas son una evidencia de que hay viriones maduros y se sabe que lleva a cabo el ciclo viral completo. La presencia de proteínas estructurales indica que el virus puede ensamblarse y liberarse de la célula para infectar nuevas células.

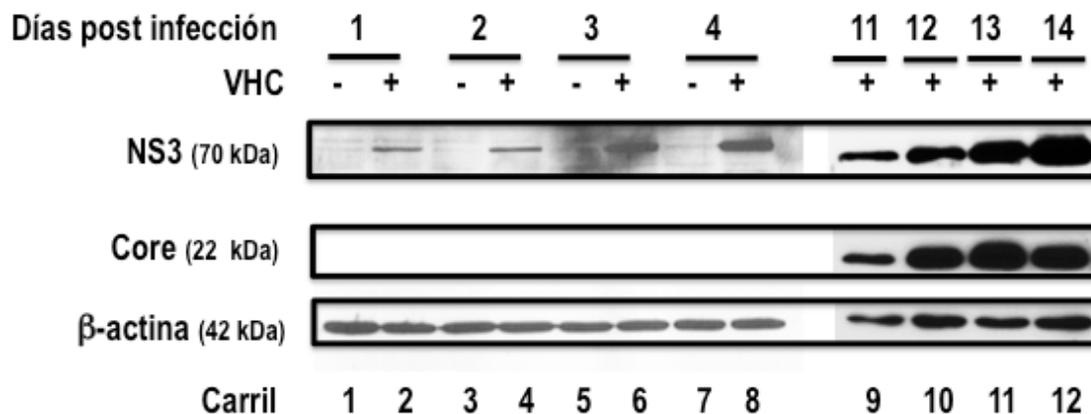


Figura 21. Ensayo de infección en células Huh7.5.1. Carriles 1-8, primeros días post-infección y carriles 9-12, últimos días post-infección. Western blot. Se observa el aumento en la expresión de las proteínas del VHC de manera directamente proporcional al tiempo, interesantemente la máxima expresión del virus ocurre a tiempos mas cortos que en los ensayos de transfección.

6.2 Evaluación de los niveles de expresión de SOD en células de hepatoma humano en presencia y ausencia de partículas infecciosas del VHC y un efector positivo de la enzima

6.2.1 Estandarización de oligos y qPCR para evaluar los sistemas antioxidantes

Se realizó PCR punto final (gradiente T°) para determinar la especificidad de los oligos y posteriormente se realizaron curvas estándares para la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés, se realizó la extracción de RNA total en células naïve para el rastreo de los transcritos de los genes : SOD1, SOD2, hCat, hGpx1 y β -actina, y se extrajo RNA de células infectadas para el rastreo del transcrito del gen NS3 del VHC, a partir de 1 μ g de RNA total se sintetizó cDNA y se prepararon las siguientes diluciones: 1:10, 1:20, 1:40,

1:80, 1:160 y 1:320, a partir de los Ct se construyeron las curvas correspondientes con los siguientes valores: SOD1 $Y = -3.322 \cdot \text{LOG}(X) + 15.10$, Eficiencia = 100.0%; SOD2 $Y = -3.626 \cdot \text{LOG}(X) + 17.42$, Eficiencia = 88.7%; hGpx SYBR, $Y = -3.537 \cdot \text{LOG}(X) + 11.75$, Eficiencia = 91.7%; hCat $Y = -3.308 \cdot \text{LOG}(X) + 18.19$, Eficiencia = 100.6%; HCVNS3 $Y = -3.203 \cdot \text{LOG}(X) + 19.25$, Eficiencia = 105.2%; β -actina $Y = -3.270 \cdot \text{LOG}(X) + 15.21$, Eficiencia = 102.2%. Las curvas para los retrotranscritos estuvieron en el rango de 90% a 110% de eficiencia, y se determinó que se trabajaría con diluciones de las muestras de cDNA 1:40 para los análisis de expresión en el sistema de infección.

6.2.2 Expresión de SOD (proteína) en células infectadas con el VHC JFH1

Se extrajo proteína total de células Huh7.5.1 naïve y células Huh7.5.1 infectadas con el VHC, a los tiempos de 0, 24, 48 y 72 h (figura 22). A) Se evaluó la expresión a nivel transcripcional de A) las enzimas SOD1 y SOD2, observándose una disminución en la expresión de la proteína SOD1 y SOD2, B) las proteínas virales NS3 y core que al mismo tiempo se observa un incremento en su expresión, a partir de las 48h, C) para SOD1 constatándose que, a las 72h hay un decremento del 50% ($p \leq 0.05$) en las células infectadas con el VHC, en comparación con células naïve (es interesante que mientras los niveles de proteína de SOD1) se ven disminuidos, las proteínas virales aumentan, coincidiendo que a las 72 h hay una mayor expresión del proteínas virales y una menor expresión de SOD1 y D) la enzima SOD2 cuyos niveles al

parecer están disminuidos en las células infectadas, pero se mantuvieron estables 0-72h.

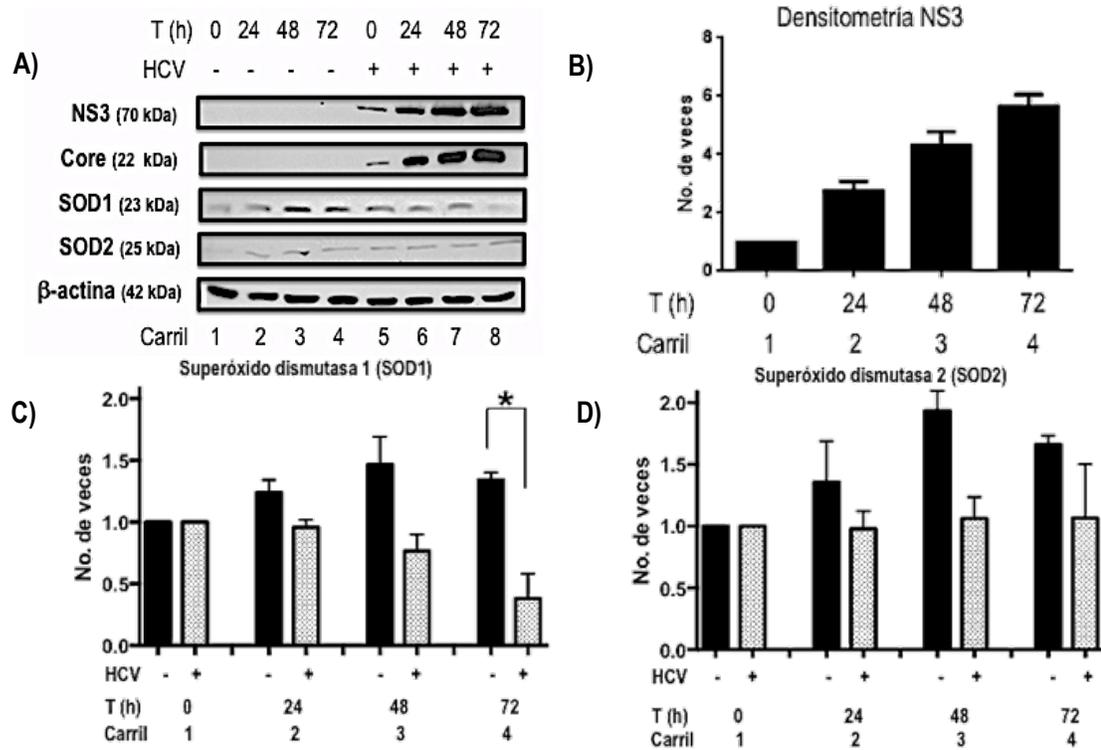


Figura 22. Niveles de expresión de proteínas celulares antioxidantes y virales. A) western blot. Se observa la expresión de proteínas virales NS3 y core; hay un decremento en los niveles de SOD1 con respecto al tiempo; no se observa un cambio en SOD2, B) densitometría de la proteína viral NS3, C) densitometría SOD1 y D) densitometría SOD2. * $p \leq 0.05$.

6.2.3 Expresión (mRNA) de los sistemas antioxidantes en células infectadas con VHC JFH1

Se extrajo RNA total de las células naïve y de las células infectadas con el VHC. Posteriormente por qPCR se midieron, los niveles de expresión a nivel transcripcional de los genes para las enzimas antioxidantes SOD1, SOD1, GPx y CAT. Al tener una disminución en los niveles de proteína, se pensó que esto

podría ser porque había una disminución de expresión de los mensajeros de estos genes, sin embargo, no se observaron cambios significativos en la expresión a nivel del mRNA de las enzimas SOD1 y SOD2, ya que fue similar en las células infectadas y no infectadas. Por otra parte la expresión del mRNA de GPx, el cuál se sabe disminuido por la presencia de proteínas virales, se redujó en las células infectadas a las 24h y 48h y para las 72h el decremento fue más del 50% ($p \leq 0.05$), en comparación con las células naïve. Finalmente no se observaron diferencias en la expresión del mRNA de CAT (figura 23).

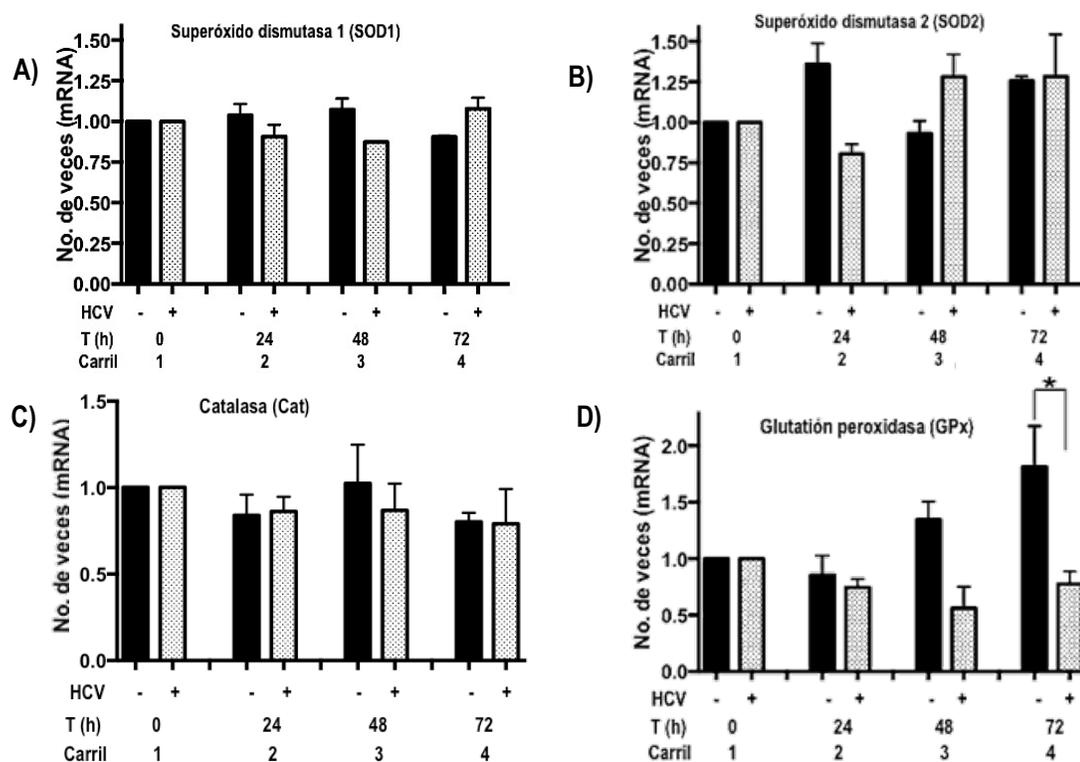


Figura 23. qPCR de los sistemas antioxidantes. A), B) y C) no se observan cambios en los niveles de mRNA de SOD1, SOD2 y tampoco en los niveles de mRNA de CAT y D) la expresión del mRNA GPx disminuye directamente proporcional al tiempo, teniendo el máximo a las 72h. * $p \leq 0.05$.

6.2.4 Expresión del VHC en células tratadas con AAS

Células infectadas con el VHC fueron tratadas con AAS 4mM y se midió la expresión viral por Western blot. El tratamiento con AAS 4mM disminuyó la expresión de las proteínas NS3 y core del VHC, mas no alteró la de GAPDH. Este efecto no había sido reportado, siendo la nuestra la primera evidencia de que el AAS disminuye la expresión del VHC cultivado en células. La expresión de las proteínas virales fue menor en las células tratadas con AAS a las 48 y 72 h, sobre todo en la expresión de la proteína no estructural core en comparación con las no tratadas (figura 24). Un efecto colateral del tratamiento fue que disminuyó la cantidad de GAPDH a las 48 y 72 h. Se probaron diferentes genes constitutivos, pero el comportamiento fue el mismo. En la tinción con Ponceau S no se observó diferencia en la cantidad de proteína cargada. Es probable que el AAS 4mM es ligeramente citotóxico para las células infectadas con el VHC JFH1, a diferencia de lo que ocurre en las células Huh7 replicón.

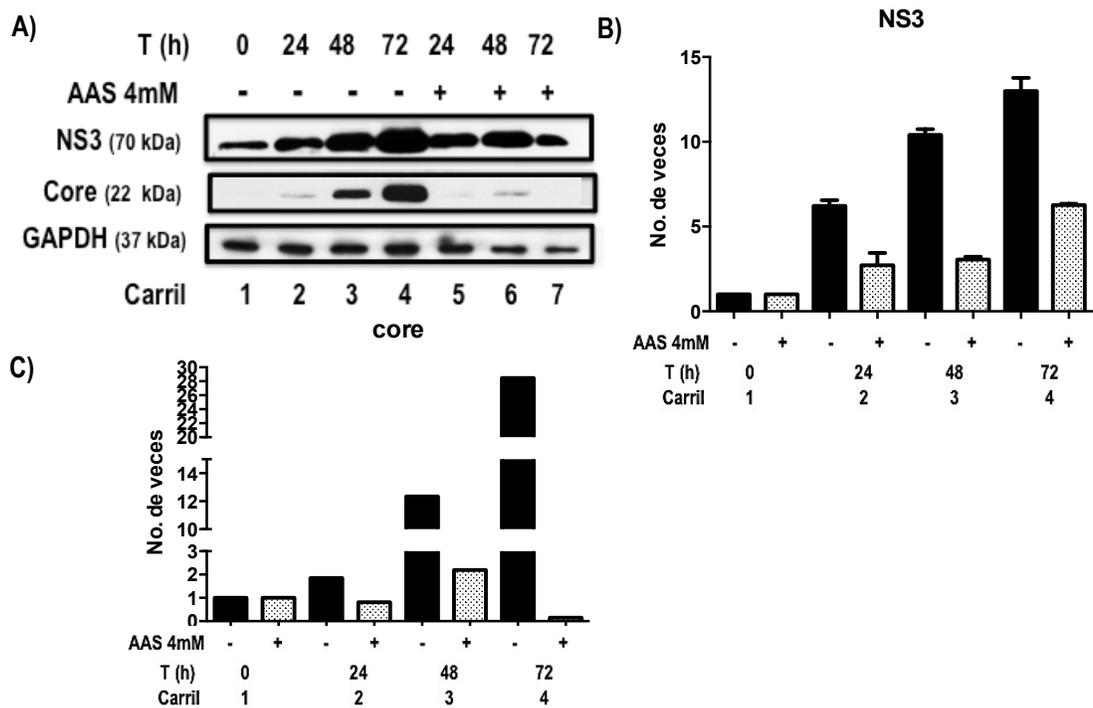


Figura 24. Expresión de NS3 y core en células infectadas con el VHC, tratadas con AAS 4 mM. A) Western blot, B) densitometría NS3 y C) densitometría core.

Para saber si esto era lo que estaba ocurriendo, se realizó un ensayo de viabilidad por MTT. Se utilizó AAS a diferentes concentraciones, 1 mM, 2 mM y 4 mM. El ensayo se evaluó a las 24, 48 y 72 h (figura 25). Se observó que a las concentraciones de 1 y 2 mM la viabilidad celular es mayor al 80% durante el tiempo de estudio. Por otra parte, cuando se utilizó AAS 4 mM se observó que a las 48 h la viabilidad es menor al 80% y a las 72 h es del 60%. Esto concuerda con lo observado cuando se midieron los genes constitutivos en los western blot, donde a las 48 y 72 h se observa una ligera disminución.

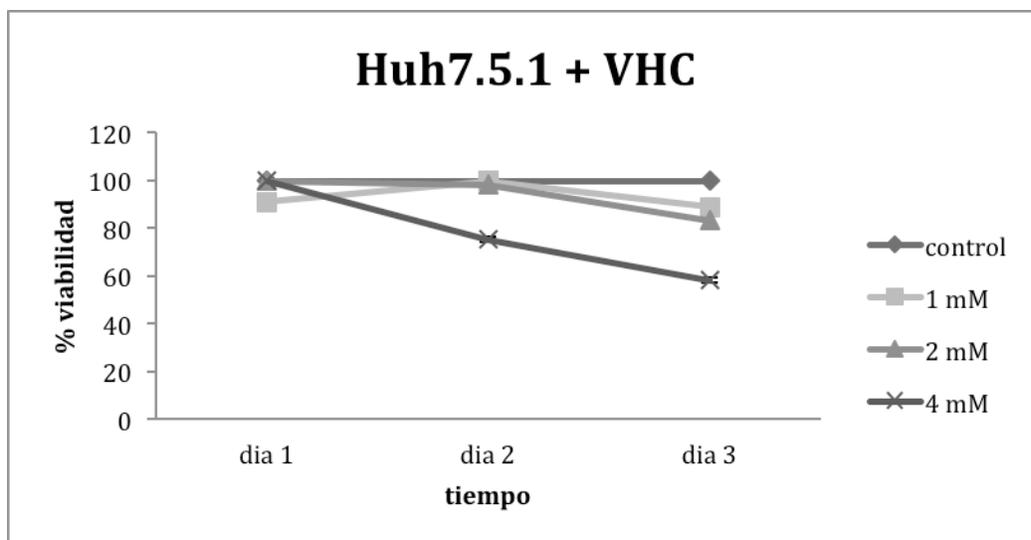


Figura 25. Ensayo de citotoxicidad MTT. Células infectadas con el VHC tratadas con AAS (1 mM, 2 mM y 4 mM). La viabilidad de las células no disminuye a más del 80% cuando se trata con AAS 1 y 2 mM. Por otra parte cuando se tratan con AAS 4 mM la viabilidad es menor al 80% a las 48h y menor a 60% a las 72h.

6.3 Silenciamiento (knock-down) mediante la tecnología de RNA de interferencia (iRNA) de la expresión de la enzima SOD1 y evaluación de su efecto en la regulación de la replicación y expresión génica del VHC.

6.3.1 Silenciamiento de la SOD1 en células que expresan proteínas del VHC

Se realizó la extracción de RNA total en células Huh7 replicón que fueron tratadas con RNA de interferencia para bloquear la expresión de la enzima SOD1. Se logró la disminución en la expresión del mRNA SOD1 desde las 24 h (alrededor del 70%) y el efecto se mantiene a las 48 y 72 h (alrededor del 50%). Se sabe que la presencia del VHC parece regular negativamente la expresión de SOD. Nosotros pensamos que al disminuir la expresión podríamos ver un

incremento en la expresión del VHC, sin embargo al medir los niveles de RNA-VHC en las células silenciadas se observó que a las 48 y 72 h hay una disminución del 50% (* $p \leq 0.05$) en la expresión (figura 26). Es interesante que al compararlo con lo observado en el sistema de infección, donde se observó que los niveles de mRNA no están alterados, el efecto del silenciamiento regula negativamente la expresión del VHC. Esto sugiere que la modulación de la expresión de la SOD1 ocurre a niveles post-traduccionales y no a nivel transcripcional.

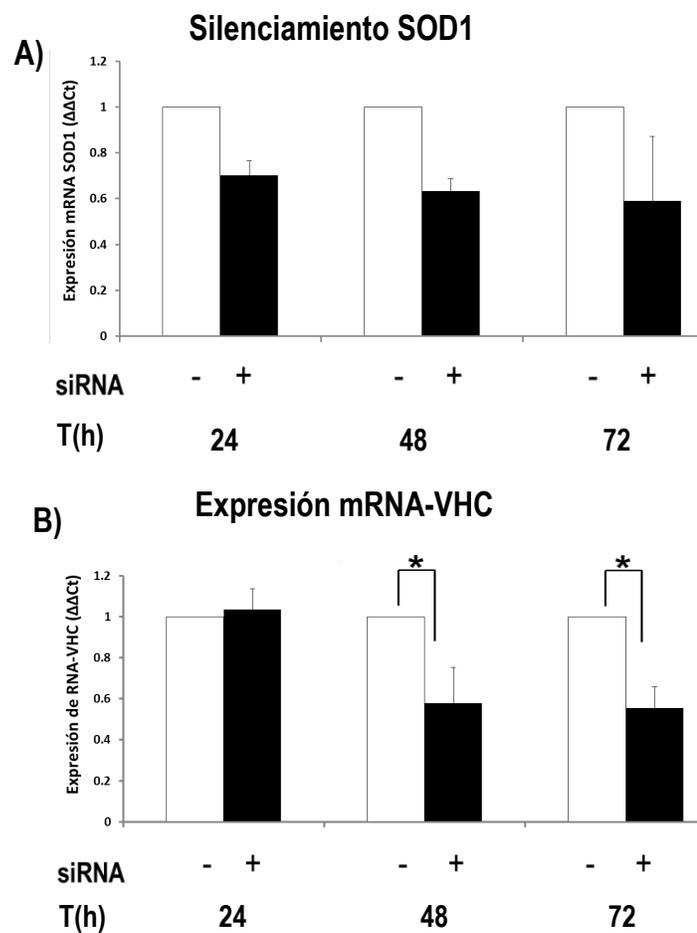


Figura 26. Efecto del silenciamiento de la SOD1 en la expresión del VHC. A) niveles de expresión de mRNA de SOD1 y B) niveles de expresión de RNA-VHC. * $p \leq 0.05$

6.4 Evaluación del efecto de la sobre-expresión transitoria de SOD1 en la regulación de la replicación y expresión génica del VHC, sistemas antioxidantes y los niveles de estrés oxidativo

6.4.1 Clonación del pcDNA4/HisB-SOD1

Se realizó la clonación de la secuencia de SOD1 en el vector de clonación y expresión pcDNA4/HisB, en bacterias competentes *E. Coli* TOP 10. Se diseñaron iniciadores para la secuencia de SOD1 humana con sitios de restricción para *Bam*HI y *Not*I (**Tabla 5**).

Tabla 5. Secuencia de primers para SOD1.

Primers SOD1	Secuencia nucleotídica
Oligo sentido	5' ATA TTA ATG GAT CCT ATG GCG ACG AAG GCC GTG TGC 3'
Oligo antisentido	5' AAT ATA TAT GCG GCC GCA TTA TTG GGC GAT CCC AAT TAC ACC 3'

Se clonó la secuencia de SOD1 a partir de RNA humano y se sintetizó el cDNA. Se realizó PCR y se corrió un gel para detectar la secuencia, utilizando GAPDH como control (figura 27).

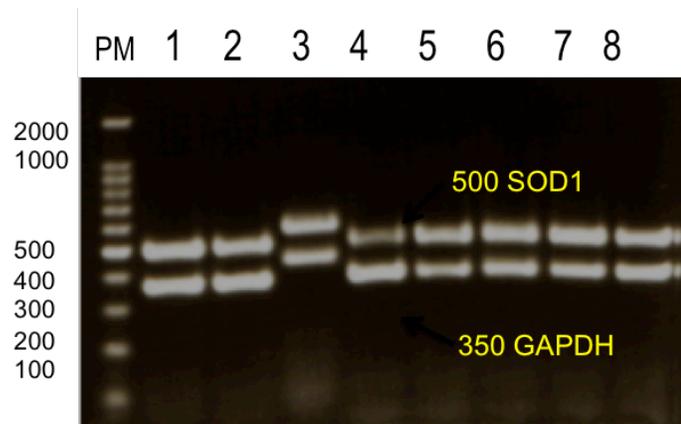


Figura 27. Electroforesis del PCR SOD1 y GAPDH. Carriles PM) Marcador de peso molecular, 1-8) clonas 1-8, respectivamente, se observan dos bandas, una de 500 pb para el gen SOD1 y otra de 350 pb para el gen control GAPDH. (Gel de agarosa 1%)

El fragmento y el vector se digirieron con *Bam*HI y *Not*I, y posteriormente se ligaron. El producto de ligación fue utilizado para transformar bacterias y se aisló el DNA plasmídico de las bacterias seleccionadas por resistencia a ampicilina. Se caracterizó con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I, se analizó el patrón de restricción y se observaron dos fragmentos uno de 5098 pb (vector linearizado) y otro de 480 pb (secuencia SOD1) (figura 28). De las transformaciones exitosas con el patrón esperado se seleccionó una clona y se creció a mayor volumen (200ml) en medio LB/Amp para producir el plásmido a gran escala. Se realizó extracción y purificación de DNA plasmídico (MAXI-PREP, Qiagen). Este plásmido se utilizó para ensayos de transfección.

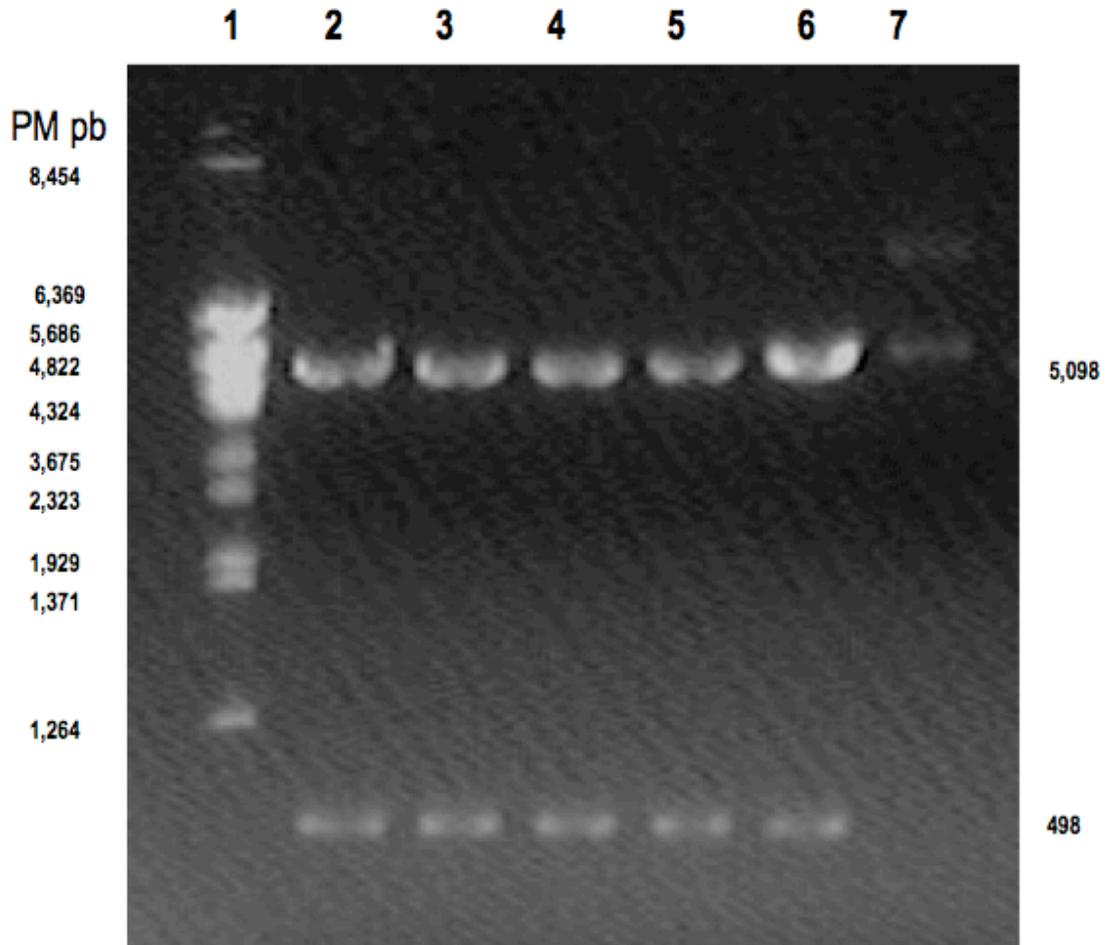


Figura 28. Clonación del plásmido pcDNA4/HisB-SOD1. Electroforesis del DNA digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I Carriles 1) Marcador de peso molecular, 2-5) clonas 1-4 respectivamente, se observan dos fragmentos de 5,098 pb y 498 pb 6) digestión control y 7) plásmido sin digerir (gel de agarosa 1%).

6.4.2 Efecto de la sobre-expresión de SOD1 en la replicación del VHC

Se realizó la transfección del pcDNA4/HisB-SOD1 en células que expresan proteínas no estructurales del VHC. Se transfectaron diferentes concentraciones del plásmido pcDNA4/HisB-SOD1 (100 ng, 250 ng y 500 ng). A las 36 h se extrajo proteína total. Se observan dos bandas correspondientes para SOD1, una es la basal y la otra corresponde a la SOD1 clonada. Se

observó la expresión proporcional a la concentración de plásmido transfectado. El aumento en la expresión de SOD1 tiene un efecto en la regulación de la expresión del VHC (NS5A). La expresión de NS5A disminuye en las células transfectadas con 100 ng de plásmido. Este efecto se incrementa a los 250 ng y de manera interesante a los 500 ng la expresión de la proteína SOD1 vuelve a incrementarse (figura 29). El incremento en la expresión de SOD1 disminuye la expresión de proteínas virales, y es directamente proporcional a la cantidad del plásmido portador del gen SOD1 transfectado. Por lo tanto, el incremento de la proteína SOD1 regula negativamente la expresión del VHC y es dependiente de la concentración.

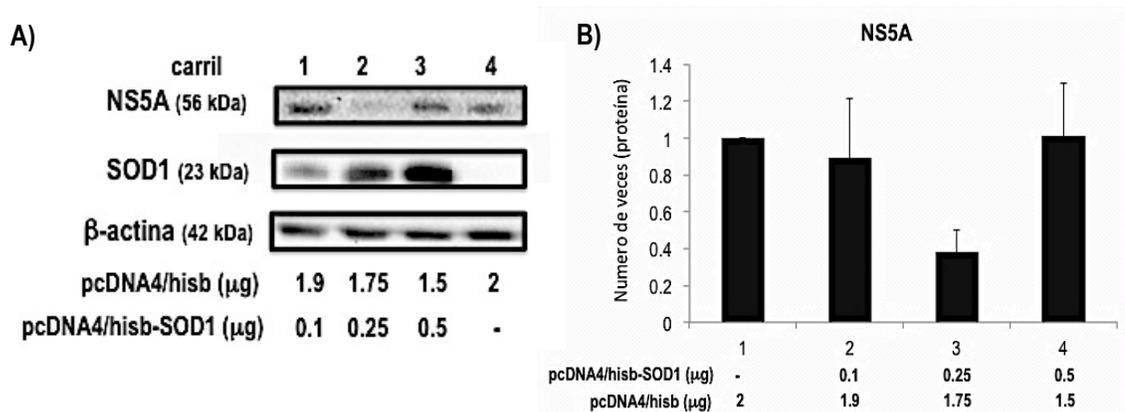


Figura 29. Efecto de la sobre-expresión de la SOD1 en la replicación del VHC. A) expresión de la proteína viral NS5A y la proteína SOD1 transfectada (100, 259 y 500 ng) y B) densitometría NS5A.

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

La hepatitis C crónica es una enfermedad emergente, actualmente afecta a 3% de la población. La terapia actual está basada en IFN y ribavirina, en conjunto con uno o más DAAs. Los estudios para lograr una terapia mas efectiva aun están en marcha. Se han propuesto diferentes mecanismos de patogenicidad mediante los cuales, la infección crónica participa en la alteración de la homeostasis hepática, incluyendo daño hepático inmunológico, toxicidad directa mediada por la producción viral y la inducción de estrés oxidativo. Hay reportes que proporcionan evidencia de la relación entre los sistemas antioxidantes y la severidad de la enfermedad hepática.

El VHC y sus proteínas estimulan la producción de ROS para establecer la infección crónica^{144,145}, tales mecanismos no han sido descritos por completo. Se sabe que la proteína core del virus^{115,116} es una de las principales implicadas en estos fenómenos, a diferencia del sistema de replicones subgenómicos. Al trabajar con el replicón genómico completo, se puede estudiar en cultivo celular las terapias y mecanismos de patogenicidad del VHC, rastreando la expresión de las proteínas estructurales y no estructurales. Gracias a la permisividad de las células Huh7.5.1 y al genoma quimérico del VHC JFH1, no sólo se tiene la producción de proteínas, sino que también se cuenta con el ensamblaje de partículas virales completas, las cuales tienen la capacidad de infectar hepatocitos naïve. Esto proporciona una valiosa herramienta para estudiar al

virus y su interacción con la célula huésped, abarcando el ciclo viral completo. Esto es de suma importancia, ya que previamente el único modelo para estudiar el ciclo completo era el chimpancé.

7.1 Modelos de estudio del VHC

En este proyecto se logró la implementación de este sistema y la estandarización para las condiciones experimentales en el estudio de VHC en cultivo celular. Este sistema es diferente al replicón subgenómico, porque implica la infección y adaptación del virus a la célula y la célula al virus. Además de que se estudia a la célula bajo condiciones en las cuales el VHC es el responsable de su replicación. Esto implica la modificación y manipulación de la maquinaria celular. Gracias a esto, los experimentos arrojan resultados que pudieran ser más representativos a lo que pudiera estar pasando en los hepatocitos de un paciente, con sus respectivas limitaciones.

7.2 Modulación de los sistemas antioxidantes por la presencia de partículas del VHC

La SOD constituye una de las defensas antioxidantes celulares en respuesta a la generación de ROS, los niveles de SOD se han observado disminuídos en pacientes con hepatitis crónica ^{103,109} y en cultivo celular ¹⁴⁶, aunque también se ha reportado el incremento¹¹¹. Nosotros observamos que la presencia del VHC en células de hepatocarcinoma disminuye la expresión a

nivel transcripcional de SOD1, mientras que a nivel traduccional no hay cambios significativos; la disminución de la enzima pudiera contribuir a los incrementos de ROS.

Los niveles de SOD2 se han encontrado elevados en pacientes¹⁴⁷ y un polimorfismo en el gen SOD2 está asociado al riesgo de hepatocarcinoma en pacientes con VHC¹⁴⁸. En nuestros experimentos no hubo variación en la expresión de SOD2 al ser evaluada a nivel transcripcional y traduccional.

Hay estudios que reportan que la presencia del VHC disminuye los niveles de glutatión, tanto en pacientes como en cultivo celular^{98,100,106}. En nuestros resultados se encontró una disminución en la expresión del mRNA de GPx en células infectadas. Esta disminución puede tener un efecto adverso en las células, ya que la capacidad para oxidar al glutatión, el cual reacciona con peróxido de hidrógeno, estaría disminuida.

Nuestros resultados muestran que las células infectadas con el VHC, tienen modificadas sus funciones de respuesta antioxidante celular. Por una parte se sabe que la presencia del virus disminuye la actividad de la SOD, y esto puede explicarse por la disminución de proteína de esta enzima, es probable que al no tener la enzima productora de peróxido de hidrógeno, la célula debido a la presencia del VHC, esté siendo regulada para no catalizar este producto, ocasionando una disminución en GPx, aunado a la disminución de glutatión. Al mismo tiempo nosotros, bajo las condiciones experimentales, no observamos un cambio a nivel transcripcional en catalasa, esto sugiere que el metabolismo del peróxido de hidrógeno esta alterado en células con infección.

7.3 Inhibición de la expresión viral por AAS

Nuestro grupo de investigación previamente ha reportado que el AAS, a concentraciones comparables con las que se utilizan para el tratamiento de pacientes con terapia anti-inflamatoria (1-5 mM), inhibió la replicación del VHC¹³⁴. Resultados de la literatura y los reportados por nuestro grupo sugieren que el AAS podría ser un buen candidato para terapia antiviral. Esto atribuido a sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias^{134,149-151}. Recientemente hemos reportado que el AAS reduce la generación de marcadores de estrés oxidativo (ROS y proteínas oxidadas). Esto correlaciona con la disminución de la expresión del RNA-VHC. También se evaluó la actividad enzimática de las enzimas GPx y SOD. El tratamiento con AAS disminuye la actividad de GPx, comparadas con el control. Por otra parte, la actividad de la Cu/Zn SOD se incrementó en el tratamiento con AAS. Después se demostró (inmunofluorescencia y RT-PCR) la sobre regulación a nivel traduccional y transcripcional de la Cu/Zn SOD en células Huh7 replicón tratadas con AAS¹³⁸. Nuestros resultados demuestran que el ASA en este sistema biológico también mantiene un efecto antiviral en células que expresan proteínas virales estructurales y no estructurales del VHC. El tratamiento con AAS disminuye la expresión de las proteína Core y NS3, en comparación con células no tratadas.

7.4 Efecto del silenciamiento de la expresión de SOD1

El silenciamiento de SOD1 tiene un efecto en la disminución de la expresión del VHC, hasta de un 50% a las 48 y 72 h. Las células que expresan proteínas del VHC tienen una disminución en la expresión de SOD1, al parecer si la disminución es mayor, no es favorable para la replicación viral. Esto pudiera explicarse debido a que la presencia de proteínas virales disminuye la expresión de SOD¹⁴⁶, por lo que al silenciar el gen, los niveles de expresión dejan de ser favorable para la replicación viral. Esto sugiere que es un proceso que debe estar finamente regulado.

7.5 Efecto de la sobre-expresión de SOD1

Se demostró que el incremento en la expresión de SOD1 disminuye la expresión de proteínas virales. Este efecto es dependiente de la cantidad de DNA transfectado. Por lo tanto, el incremento de la proteína SOD1 regula negativamente la expresión del VHC. Esto concuerda con lo reportado en pacientes que al ser tratados con IFN y ribavirina tienen un incremento en los niveles séricos de SOD¹⁰⁹ y en el tratamiento con AAS, el cual disminuye la replicación viral e induce el aumento en la actividad de Cu/Zn SOD y su expresión¹³⁸. También se ha reportado que el incremento en los sistemas antioxidantes CuZnSOD/MnSOD/Cat disminuye la autofagia de la proteína core¹⁵².

CAPITULO VIII

CONCLUSIONES

1. Se logró la producción de partículas virales infecciosas en cultivo celular, las cuales tienen la capacidad de generar RNA viral, sintetizar proteínas estructurales y no estructurales, y llevar a cabo el ciclo viral completo.
2. Existe una expresión diferencial en los niveles de expresión de los isotipos de SOD y la presencia de partículas infecciosas del VHC *in vitro* modifica la expresión de la proteína SOD1, mientras que la SOD2 se mantiene estable.
3. A nivel transcripcional SOD1 y SOD2 no presentaron diferencias de expresión, en comparación con células naïve.
4. Los niveles de mRNA de GPx disminuyen desde las 24 h y esta disminución es mas evidente a las 72 h.
5. El tratamiento con AAS 4mM inhibió la expresión de proteínas virales (NS3 y core) en células infectadas con el VHC. En este sistema del replicón genómico completo se observó el efecto antiviral del AAS.
6. Se logró el silenciamiento de la SOD1 en células Huh7 que expresan el replicón subgenómico de VHC. El silenciamiento de SOD1 regula negativamente la expresión del RNA-VHC.
7. Se realizó la construcción de un vector de expresión que codifica para el gen de la SOD1. A su vez se consiguió la sobreexpresión del gen en células Huh7 que expresan el replicón subgenómico del VHC. La

sobreexpresión de SOD1 también modula la expresión de las proteínas del VHC y este efecto es dependiente de la cantidad de DNA transfectada.

8. Los resultados sugieren que bajo las condiciones evaluadas, la SOD1 tiene una acción dual en la modulación de la replicación del VHC.

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFÍA

1. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:74-81. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01934.x.
2. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. *J Clin Pharmacol.* 2004;44(1):20-9. doi:10.1177/0091270003258669.
3. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):107-15. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03432.x.
4. Hepatitis C--global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec.* 1999;74(49):425-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10645164>. Accessed May 30, 2014.
5. Parfieniuk A, Jaroszewicz J, Flisiak R. Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus. *World J Gastroenterol.* 2007;13(43):5673-81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604114>.
6. Rantala M, van de Laar MJW. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. *Euro Surveill.* 2008;13(21). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18761967>. Accessed May 30, 2014.
7. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med.* 2006;144(10):705-14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702586>. Accessed May 30, 2014.
8. Vriend HJ, Op de Coul ELM, van de Laar TJW, Urbanus AT, van der Klis FRM, Boot HJ. Hepatitis C virus seroprevalence in the Netherlands. *Eur J Public Health.* 2012;22(6):819-21. doi:10.1093/eurpub/cks013.
9. Dalgard O, Jeansson S, Skaug K, Raknerud N, Bell H. Hepatitis C in the general adult population of Oslo: prevalence and clinical spectrum. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38(8):864-70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12940441>. Accessed May 26, 2014.
10. Harris RJ, Ramsay M, Hope VD, et al. Hepatitis C prevalence in England remains low and varies by ethnicity: an updated evidence synthesis. *Eur J Public Health.* 2012;22(2):187-92. doi:10.1093/eurpub/ckr083.

11. Meffre C, Le Strat Y, Delarocque-Astagneau E, et al. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus infections in France in 2004: social factors are important predictors after adjusting for known risk factors. *J Med Virol*. 2010;82(4):546-55. doi:10.1002/jmv.21734.
12. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(9):553-62. doi:10.1038/nrgastro.2013.107.
13. Burguete-García AI, Conde-González CJ J-MR. Hepatitis C seroprevalence and correlation between viral load and viral genotype among primary care clients in Mexico. *Salud Publica Mex*. 2011;53:7-12.
14. Negro F, Alberti A. The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2011;31 Suppl 2:1-3. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02537.x.
15. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*. 2003;52(RR-3):1-13, 15; quiz CE1-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12585742>. Accessed August 28, 2013.
16. NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. *NIH Consens State Sci Statements*. 19(3):1-46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14768714>. Accessed August 28, 2013.
17. [Hepatitis C as a public health problem in Mexico]. *Salud Publica Mex*. 2011;53 Suppl 1:S61-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21877075>. Accessed August 28, 2013.
18. Méndez-Sánchez N, Gutiérrez-Grobe Y, Kobashi-Margáin RA. Epidemiology of HCV infection in Latin America. *Ann Hepatol*. 2010;9 Suppl:27-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713991>. Accessed August 28, 2013.
19. Vogel M, Deterding K, Wiegand J, et al. Initial presentation of acute hepatitis C virus (HCV) infection among HIV-negative and HIV-positive individuals-experience from 2 large German networks on the study of acute HCV infection. *Clin Infect Dis*. 2009;49(2):317-9; author reply 319. doi:10.1086/600058.
20. Stefan M, Thomas B, Juergen R, Sarrazin C, Heiner W. *Hepatology A Clinical Textbook*. 5th ed. Frankfurt: Flying Publisher; 2014:612. Available at: <http://www.hepatologytextbook.com/>. Accessed May 30, 2014.
21. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan O V, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*. 1999;341(8):556-62. doi:10.1056/NEJM199908193410802.
22. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C Virus Infection — NEJM. *NEJM*. 2001:41-52. Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200107053450107>. Accessed May 20, 2014.

23. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461(7265):798-801. doi:10.1038/nature08463.
24. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1338-45, 1345.e1-7. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.056.
25. Vogt M, Lang T, Frösner G, et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med*. 1999;341(12):866-70. doi:10.1056/NEJM199909163411202.
26. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461(7262):399-401. doi:10.1038/nature08309.
27. Merican I, Sherlock S, McIntyre N, Dusheiko GM. Clinical, biochemical and histological features in 102 patients with chronic hepatitis C virus infection. *Q J Med*. 1993;86(2):119-25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8464987>. Accessed May 20, 2014.
28. Martinot-Peignoux M, Boyer N, Cazals-Hatem D, et al. Prospective study on anti-hepatitis C virus-positive patients with persistently normal serum alanine transaminase with or without detectable serum hepatitis C virus RNA. *Hepatology*. 2001;34(5):1000-5. doi:10.1053/jhep.2001.28458.
29. Puoti C, Castellacci R, Montagnese F, et al. Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol*. 2002;37(1):117-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076870>. Accessed May 20, 2014.
30. Mathurin P, Moussalli J, Cadranel JF, et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminase activity. *Hepatology*. 1998;27(3):868-72. doi:10.1002/hep.510270333.
31. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997;349(9055):825-32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9121257>. Accessed May 9, 2014.
32. Wiese M, Berr F, Lafrenz M, Porst H, Oesen U. Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in Germany: a 20-year multicenter study. *Hepatology*. 2000;32(1):91-6. doi:10.1053/jhep.2000.8169.
33. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology*. 2006;43(6):1303-10. doi:10.1002/hep.21176.

34. De Lédighen V, Trimoulet P, Mannant P-R, et al. Outbreak of hepatitis C virus infection during sclerotherapy of varicose veins: long-term follow-up of 196 patients (4535 patient-years). *J Hepatol*. 2007;46(1):19-25. doi:10.1016/j.jhep.2006.07.029.
35. Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med*. 1995;332(22):1463-6. doi:10.1056/NEJM199506013322202.
36. Planas R, Ballesté B, Alvarez MA, et al. Natural history of decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis. A study of 200 patients. *J Hepatol*. 2004;40(5):823-30. doi:10.1016/j.jhep.2004.01.005.
37. Di Bisceglie AM. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1997;26(3 Suppl 1):34S-38S. doi:10.1002/hep.510260706.
38. Fattovich G, Giustina G, Degos F, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*. 1997;112(2):463-72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024300>. Accessed May 20, 2014.
39. Svirtlih N, Jevtovic D, Simonovic J, et al. Older age at the time of liver biopsy is the important risk factor for advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*. 2007;54(80):2324-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18265657>. Accessed May 20, 2014.
40. Sterling RK, Stravitz RT, Luketic VA, et al. A comparison of the spectrum of chronic hepatitis C virus between Caucasians and African Americans. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(6):469-73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181614>. Accessed May 20, 2014.
41. Gitto S, Micco L, Conti F, Andreone P, Bernardi M. Alcohol and viral hepatitis: a mini-review. *Dig Liver Dis*. 2009;41(1):67-70. doi:10.1016/j.dld.2008.05.009.
42. Jonsson JR, Purdie DM, Clouston AD, Powell EE. Recognition of genetic factors influencing the progression of hepatitis C : potential for personalized therapy. *Mol Diagn Ther*. 2008;12(4):209-18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18652517>. Accessed May 20, 2014.
43. Zimmer V, Lammert F. Genetics and epigenetics in the fibrogenic evolution of chronic liver diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25(2):269-80. doi:10.1016/j.bpg.2011.02.007.
44. Lim Y-S, Kim WR. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. *Clin Liver Dis*. 2008;12(4):733-46, vii. doi:10.1016/j.cld.2008.07.007.
45. Gebo KA, Herlong HF, Torbenson MS, et al. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S161-72. doi:10.1053/jhep.2002.36989.

46. Caviglia GP, Ciancio A, Rosso C, et al. Non-invasive methods for the assessment of hepatic fibrosis: transient elastography, hyaluronic acid, ¹³C-aminopyrine breath test and cytokeratin 18 fragment. *Ann Hepatol*. 13(1):91-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378271>. Accessed May 20, 2014.
47. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347(13):975-82. doi:10.1056/NEJMoa020047.
48. Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004;140(5):346-55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996676>. Accessed August 10, 2013.
49. Hofmann WP, Sarrazin C, Zeuzem S. Current standards in the treatment of chronic hepatitis C. *Dtsch Arztebl Int*. 2012;109(19):352-8. doi:10.3238/arztebl.2012.0352.
50. Reesink HW, Zeuzem S, Weegink CJ, et al. Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology*. 2006;131(4):997-1002. doi:10.1053/j.gastro.2006.07.013.
51. Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1767-77. doi:10.1053/j.gastro.2007.02.037.
52. Barnard RJO, Howe JA, Ogert RA, et al. Analysis of boceprevir resistance associated amino acid variants (RAVs) in two phase 3 boceprevir clinical studies. *Virology*. 2013;444(1-2):329-36. doi:10.1016/j.virol.2013.06.029.
53. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011;54(4):1433-44. doi:10.1002/hep.24641.
54. Lawitz E, Poordad FF, Pang PS, et al. Sofosbuvir and ledipasvir fixed-dose combination with and without ribavirin in treatment-naive and previously treated patients with genotype 1 hepatitis C virus infection (LONESTAR): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2014;383(9916):515-23. doi:10.1016/S0140-6736(13)62121-2.
55. Dvory-Sobol H, Wong KA, Ku KS, et al. Characterization of resistance to the protease inhibitor GS-9451 in hepatitis C virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(10):5289-95. doi:10.1128/AAC.00780-12.
56. Chayama K, Takahashi S, Toyota J, et al. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology*. 2012;55(3):742-8. doi:10.1002/hep.24724.

57. Scheel TKH, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med.* 2013;19(7):837-49. doi:10.1038/nm.3248.
58. Stapleton JT, Fong S, Muerhoff AS, Bukh J, Simmonds P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 2):233-46. doi:10.1099/vir.0.027490-0.
59. Lindeback BD RC. *flaviviridae the viruses and their replication.*; 2001:991-1042.
60. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology [2006] - PubMed - NCBI. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=molecular+biology+hcv+book>. Accessed August 28, 2013.
61. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(6):2057-61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53625&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 28, 2013.
62. Farci P, Shimoda A, Wong D, et al. Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15394-9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26415&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 28, 2013.
63. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 11):3173-88. doi:10.1099/vir.0.80401-0.
64. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005;42(4):962-73. doi:10.1002/hep.20819.
65. Ndjomou J, Pybus OG, Matz B. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 9):2333-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917453>. Accessed May 22, 2014.
66. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource. *Hepatology.* 2014;59(1):318-27. doi:10.1002/hep.26744.
67. Fukushi S, Katayama K, Kurihara C, et al. Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;199(2):425-32. doi:10.1006/bbrc.1994.1246.
68. Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol.* 1999;73(2):1165-74. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=103937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed May 22, 2014.

69. Wang C, Sarnow P, Siddiqui a. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol.* 1993;67(6):3338-44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=237677&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
70. Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Shimotohno K. A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215(2):744-9. doi:10.1006/bbrc.1995.2526.
71. Blight KJ, Rice CM. Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol.* 1997;71(10):7345-52. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=192079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed May 22, 2014.
72. Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, et al. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology.* 1996;222(1):31-42. doi:10.1006/viro.1996.0395.
73. McGivern DR, Lemon SM. Model systems for hepatitis C research: the cup half empty? *Gastroenterology.* 2011;141(3):806-9. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.028.
74. Gottwein JM, Bukh J. Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. *Adv Virus Res.* 2008;71:51-133. doi:10.1016/S0065-3527(08)00002-X.
75. Bukh J, Meuleman P, Tellier R, et al. Challenge pools of hepatitis C virus genotypes 1-6 prototype strains: replication fitness and pathogenicity in chimpanzees and human liver-chimeric mouse models. *J Infect Dis.* 2010;201(9):1381-9. doi:10.1086/651579.
76. Bukh J. A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C. *Hepatology.* 2004;39(6):1469-75. doi:10.1002/hep.20268.
77. Pileri P. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science (80-).* 1998;282(5390):938-941. doi:10.1126/science.282.5390.938.
78. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(19):7270-4. doi:10.1073/pnas.0402253101.
79. Flint M, McKeating JA. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol.* 10(2):101-17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713597>. Accessed August 28, 2013.

80. Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, et al. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(5):1759-63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=39854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 28, 2013.
81. Lescar J, Roussel A, Wien MW, et al. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*. 2001;105(1):137-48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301009>. Accessed August 28, 2013.
82. Yagnik AT, Lahm A, Meola A, et al. A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins*. 2000;40(3):355-66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861927>. Accessed August 28, 2013.
83. Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis*. 2003;7(1):45-66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12691458>. Accessed August 28, 2013.
84. Lohmann V. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science (80-)*. 1999;285(5424):110-113. doi:10.1126/science.285.5424.110.
85. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2334-9. doi:10.1038/nprot.2006.395.
86. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 2005;309(5734):623-6. doi:10.1126/science.1114016.
87. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005;11(7):791-6. doi:10.1038/nm1268.
88. Kneteman NM, Toso C. In vivo study of HCV in mice with chimeric human livers. *Methods Mol Biol*. 2009;510:383-99. doi:10.1007/978-1-59745-394-3_29.
89. Barth H, Robinet E, Liang TJ, Baumert TF. Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions. *J Hepatol*. 2008;49(1):134-42. doi:10.1016/j.jhep.2008.03.012.
90. Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, et al. Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. *Hepatology*. 2005;41(4):847-56. doi:10.1002/hep.20657.
91. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*. 2001;7(8):927-33. doi:10.1038/90968.
92. Vanwolleghem T, Libbrecht L, Hansen BE, et al. Factors determining successful engraftment of hepatocytes and susceptibility to hepatitis B and C virus infection in uPA-SCID mice. *J Hepatol*. 2010;53(3):468-76. doi:10.1016/j.jhep.2010.03.024.

93. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):958-65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583749>. Accessed August 10, 2013.
94. Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, et al. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci*. 2011;16(6):300-9. doi:10.1016/j.tplants.2011.03.007.
95. Go Y-M, Jones DP. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1273-90. doi:10.1016/j.bbagen.2008.01.011.
96. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(1):49-89. doi:10.1089/ars.2007.9.49.
97. Valgimigli M, Valgimigli L, Trerè D, et al. Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation. *Free Radic Res*. 2002;36(9):939-48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448819>. Accessed September 13, 2013.
98. Capone F, Guerriero E, Sorice A, et al. Characterization of metalloproteinases, oxidative status and inflammation levels in the different stages of fibrosis in HCV patients. *Clin Biochem*. 2012;45(7-8):525-9. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.02.004.
99. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med*. 30(1-2):29-41. doi:10.1016/j.mam.2008.08.003.
100. Swietek K, Juszczak J. Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat*. 1997;4(2):139-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097271>. Accessed September 13, 2013.
101. Look MP, Gerard A, Rao GS, et al. Interferon/antioxidant combination therapy for chronic hepatitis C--a controlled pilot trial. *Antiviral Res*. 1999;43(2):113-22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10517313>. Accessed September 13, 2013.
102. Vendemiale G, Grattagliano I, Portincasa P, Serviddio G, Palasciameo G, Altomare E. Oxidative stress in symptom-free HCV carriers: relation with ALT flare-up. *Eur J Clin Invest*. 2001;31(1):54-63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168439>. Accessed September 13, 2013.
103. Bhargava A, Raghuram G V, Pathak N, et al. Occult hepatitis C virus elicits mitochondrial oxidative stress in lymphocytes and triggers PI3-kinase-mediated DNA damage response. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(9):1806-14. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.009.
104. Yadav D, Hertan HI, Schweitzer P, Norkus EP, Pitchumoni CS. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(10):2634-9. doi:10.1111/j.1572-0241.2002.06041.x.

105. Salem TA, El-Refaei MF, Badra GA. Study of antioxidant enzymes level and phagocytic activity in chronic liver disease patients. *Egypt J Immunol*. 2003;10(1):37-45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719621>. Accessed September 13, 2013.
106. Venturini D, Simão ANC, Barbosa DS, et al. Increased oxidative stress, decreased total antioxidant capacity, and iron overload in untreated patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2010;55(4):1120-7. doi:10.1007/s10620-009-0833-1.
107. Barbaro G, Di Lorenzo G, Ribersani M, et al. Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. *J Hepatol*. 1999;30(5):774-82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10365801>. Accessed September 13, 2013.
108. Bessa SSE-D, Mohamed Ali EM, Abd El-Wahab AE-S, Nor El-Din SAE-M. Heme oxygenase-1 mRNA expression in egyptian patients with chronic liver disease. *Hepat Mon*. 2012;12(4):278-85. doi:10.5812/hepatmon.846.
109. Levent G, Ali A, Ahmet A, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J Transl Med*. 2006;4:25. doi:10.1186/1479-5876-4-25.
110. Osman HG, Gabr OM, Lotfy S, Gabr S. Serum levels of bcl-2 and cellular oxidative stress in patients with viral hepatitis. *Indian J Med Microbiol*. 2007;25(4):323-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18087079>. Accessed September 13, 2013.
111. Larrea E, Beloqui O, Muñoz-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(7-8):1235-41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626579>. Accessed September 13, 2013.
112. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al. Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2000;33(4):616-22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11059866>. Accessed September 13, 2013.
113. Nakashima T, Sumida Y, Yoh T, et al. Thioredoxin levels in the sera of untreated viral hepatitis patients and those treated with glycyrrhizin or ursodeoxycholic acid. *Antioxid Redox Signal*. 2000;2(4):687-94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11213474>. Accessed September 13, 2013.
114. Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22 Suppl 1:S108-11. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04669.x.
115. Ivanov A V, Smirnova O a, Ivanova ON, Masalova O V, Kochetkov SN, Isaguliants MG. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One*. 2011;6(9):e24957. doi:10.1371/journal.pone.0024957.

116. Pal S, Polyak SJ, Bano N, et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(3):627-34. doi:10.1111/j.1440-1746.2009.06128.x.
117. Bureau C, Bernad J, Chaouche N, et al. Nonstructural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2001;276(25):23077-83. doi:10.1074/jbc.M100698200.
118. García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, González-Pérez P, et al. Differential contribution of hepatitis C virus NS5A and core proteins to the induction of oxidative and nitrosative stress in human hepatocyte-derived cells. *J Hepatol*. 2005;43(4):606-13. doi:10.1016/j.jhep.2005.04.019.
119. Thorén F, Romero A, Lindh M, Dahlgren C, Hellstrand K. A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *J Leukoc Biol*. 2004;76(6):1180-6. doi:10.1189/jlb.0704387.
120. García-Monzón C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario A, Moreno-Otero R. Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol*. 2000;32(2):331-8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707875>. Accessed September 13, 2013.
121. Ming-Ju H, Yih-Shou H, Tzy-Yen C, Hui-Ling C. Hepatitis C virus E2 protein induce reactive oxygen species (ROS)-related fibrogenesis in the HSC-T6 hepatic stellate cell line. *J Cell Biochem*. 2011;112(1):233-43. doi:10.1002/jcb.22926.
122. Liang Y, Ye H, Kang CB, Yoon HS. Domain 2 of nonstructural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus is natively unfolded. *Biochemistry*. 2007;46(41):11550-8. doi:10.1021/bi700776e.
123. Yen H-H, Shih K-L, Lin T-T, Su W-W, Soon M-S, Liu C-S. Decreased mitochondrial deoxyribonucleic acid and increased oxidative damage in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2012;18(36):5084-9. doi:10.3748/wjg.v18.i36.5084.
124. Piccoli C, Quarato G, Ripoli M, et al. HCV infection induces mitochondrial bioenergetic unbalance: causes and effects. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(5):539-46. doi:10.1016/j.bbabi.2008.11.008.
125. Piccoli C, Scrima R, D'Aprile A, et al. Mitochondrial dysfunction in hepatitis C virus infection. *Biochim Biophys Acta*. 1757(9-10):1429-37. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.018.
126. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui a. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(17):9599-604. doi:10.1073/pnas.171311298.

127. Okuda M, Li K, Beard MR, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*. 2002;122(2):366-75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832451>. Accessed September 8, 2013.
128. Li S, Ye L, Yu X, et al. Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology*. 2009;391(2):257-64. doi:10.1016/j.virol.2009.06.039.
129. Qadri I, Iwahashi M, Capasso JM, et al. Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1. *Biochem J*. 2004;378(Pt 3):919-28. doi:10.1042/BJ20031587.
130. Jaiswal M, LaRusso NF, Shapiro RA, Billiar TR, Gores GJ. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterology*. 2001;120(1):190-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208728>. Accessed September 13, 2013.
131. Machida K, McNamara G, Cheng KT-H, et al. Hepatitis C virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/Mre11/Rad50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes. *J Immunol*. 2010;185(11):6985-98. doi:10.4049/jimmunol.1000618.
132. Machida K, Tsukamoto H, Liu J-C, et al. c-Jun mediates hepatitis C virus hepatocarcinogenesis through signal transducer and activator of transcription 3 and nitric oxide-dependent impairment of oxidative DNA repair. *Hepatology*. 2010;52(2):480-92. doi:10.1002/hep.23697.
133. Liao C, Lin Y, Wu B, et al. Salicylates Inhibit Flavivirus Replication Independently of Blocking Nuclear Factor Kappa B Activation. 2001;75(17):7828-7839. doi:10.1128/JVI.75.17.7828.
134. Trujillo-Murillo K, Rincón-Sánchez AR, Martínez-Rodríguez H, et al. Acetylsalicylic acid inhibits hepatitis C virus RNA and protein expression through cyclooxygenase 2 signaling pathways. *Hepatology*. 2008;47(5):1462-72. doi:10.1002/hep.22215.
135. Waris G, Tardif KD, Siddiqui A. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(10):1425-30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417255>. Accessed November 11, 2013.
136. Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C Virus Stimulates the Expression of Cyclooxygenase-2 via Oxidative Stress : Role of Prostaglandin E 2 in RNA Replication. 2005;79(15):9725-9734. doi:10.1128/JVI.79.15.9725.
137. Tardif KD, Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol*. 2005;13(4):159-63. doi:10.1016/j.tim.2005.02.004.

138. Rivas-Estilla AM, Bryan-Marrugo OL, Trujillo-Murillo K, et al. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) induction is implicated in the antioxidative and antiviral activity of acetylsalicylic acid in HCV-expressing cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(11):G1264-73. doi:10.1152/ajpgi.00237.2011.
139. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226(2):561-5. doi:10.1006/bbrc.1996.1394.
140. Peskin A V, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta*. 2000;293(1-2):157-66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699430>. Accessed November 12, 2013.
141. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 1995;11(4):376-81. doi:10.1038/ng1295-376.
142. Elchuri S, Oberley TD, Qi W, et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. 2005;24(3):367-80. doi:10.1038/sj.onc.1208207.
143. Sentman M-L, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 2006;281(11):6904-9. doi:10.1074/jbc.M510764200.
144. Van Rossum TG, Vulto AG, Hop WC, Brouwer JT, Niesters HG, Schalm SW. Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999;14(11):1093-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574137>. Accessed May 16, 2014.
145. Paracha UZ, Fatima K, Alqahtani M, et al. Oxidative stress and hepatitis C virus. *Virology*. 2013;10(1):251. doi:10.1186/1743-422X-10-251.
146. Wang T, Campbell R V, Yi MK, Lemon SM, Weinman SA. Role of Hepatitis C virus core protein in viral-induced mitochondrial dysfunction. *J Viral Hepat*. 2010;17(11):784-93. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01238.x.
147. Tamai T, Uto H, Takami Y, et al. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2011;17(44):4890-8. doi:10.3748/wjg.v17.i44.4890.
148. Ezzikouri S, El Feydi AE, Chafik A, et al. Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected Moroccan patients. *Mutat Res*. 2008;649(1-2):1-6. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.05.019.

149. Kopff M, Kopff A, Kowalczyk E. [The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative/antioxidative balance]. *Pol Merkur Lekarski*. 2007;23(135):184-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18080691>. Accessed May 16, 2014.
150. Speir E, Yu ZX, Ferrans VJ, Huang ES, Epstein SE. Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res*. 1998;83(2):210-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686761>. Accessed May 16, 2014.
151. Planagumà A, Titos E, López-Parra M, et al. Aspirin (ASA) regulates 5-lipoxygenase activity and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated CINC-1 release in rat liver cells: novel actions of lipoxin A4 (LXA4) and ASA-triggered 15-epi-LXA4. *FASEB J*. 2002;16(14):1937-9. doi:10.1096/fj.02-0224fje.
152. Chu VC, Bhattacharya S, Nomoto A, et al. Persistent expression of hepatitis C virus non-structural proteins leads to increased autophagy and mitochondrial injury in human hepatoma cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e28551. doi:10.1371/journal.pone.0028551.

ANEXOS

1. Trabajo en campana de cultivo (general)

- La limpieza de la zona de trabajo se realizó con solución al 10% de Dodecil sulfato de sodio (SDS; Marca USB. Cat. S5010); así como con etanol al 70% (Etanol desnaturalizado; marca Jaico, México), ambas en agua ultrapura.
- Los procedimientos de cultivo celular para la línea Huh-7 se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca NUAIRE). Para el mantenimiento de la línea celular se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM), L- Glutamina (200 mM; 100X), suero bovino fetal (SBF), Tripsina-EDTA (0.25%), solución de antibiótico penicilina-estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina) y solución de aminoácidos no esenciales (10 mM; 100X), todos de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, N.Y.).
- Para los lavados de las células se empleó una solución buffer de fosfatos (PBS) 1X.
- Para la congelación de líneas celulares se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) de la compañía Sigma.
- Para realizar el recuento celular se empleó el colorante vital azul tripano 0.4% (marca GIBCO-BRL, Grand Island, N.Y.).

2. Cultivo celular del VHC

2.1 Preparación del templado

1. Obtenga el plásmido JFH1 en cantidad y calidad apropiada (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Si es necesario, incluya controles negativos de constructos, como el constructo de replicación-incompetente (pJGH1/GND), un constructo con delección en la región de envoltura (pJGH1/ Δ E1-E2) o el replicón subgenómico (pSGR-JFH1).

2. Digerir el DNA pJFH1 con enzimas de restricción y enzimas al combinar los reactivos como se indica:

Reactivo	Cantidad
DNA pJFH1 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	8 μl (16 μg)
NEBuffer 2 (10x)	5 μl (1x concentración final)
<i>Xba</i> I (100 U/ μl)	1 μl (100U)
Agua libre de nucleasa	36 μl
Volumen total	50 μl

3. Incubar las reacciones de digestión por 1-2 h en un bloque de calor a 37°C.

4. Verificar la digestión completa del DNA pJAFH1 separando 0.5 μl de la muestra digerida, junto con el marcador 1Kb Plus DNA Ladder, por electroforesis a través de un gel de agarosa 1% que contenga bromuro de etidio 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5. Mezcle el producto de digestión con 50 μ l de buffer TE. Pipetear dentro del tubo 100 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1; extracción fenol-cloroformo-alcohol isoamílico)
 6. Agite vigorosamente y centrifugue por 15 min a 12,000g a 20-25 °C
 7. Transfiera la fase acuosa a un nuevo tubo
 8. Pipetee 100 μ l de cloroformo en el tubo. Agite vigorosamente y centrifugue por 5 min a 12,000g a temperatura ambiente. (extracción clorofórmica).
 9. Transfiera la fase acuosa a un nuevo tubo y agregue 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M, 2.5 volúmenes de etanol 99.5% y 1/100 volúmenes de glicógeno en el tubo (precipitación etanólica)
 10. Almacene durante 20 min a -80 °C.
 11. Centrifugue por 20 minutos a 12,000g a 4 °C.
 12. Descarte el sobrenadante y lave el pellet con 500 μ l de etanol al 70%.
 13. Centrifugue por 15 min a 12,000g y a 4 °C.
 14. Descarte el sobrenadante y seque el pellet a temperatura ambiente.
 15. Resuspenda el pellet en 43 μ l de agua libre de nucleasas.
- *Punto de pausa.** La solución de DNA puede ser almacenada a -80 °C hasta uso posterior.

16. Trate el DNA con la enzima Mung bean nucleasa combinando los reactivos como se indica:

Reactivo	Cantidad
DNA digerido	43 μ l
Mung bean nucleasa Buffer (10x)	5 μ l (1x concentración final)
Mung bean nucleasa (100 U/ml)	2 μ l (20U)
Volumen total	50 μl

17. Incubar por 30 min en un bloque térmico a 30 °C.

18. Trate con proteinasa K combinando los reactivos como se indica:

Reactivo	Cantidad
DNA tratado con Mung bean	50 μ l
SDS 10%(p/v)	10 μ l
Proteinasa K (20 μ g/ μ l)	2 μ l (40 μ g)
Agua libre de nucleasas	138 μ l
Volumen total	200 μl

19. Incube por 1 h en un bloque térmico a 50 °C.

20. Extraiga con 200 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) como se describió en los pasos 5-7.

21. Extraiga con 200 μ l de cloroformo como se describió en el paso 8.

22. Precipite el DNA por precipitación con etanol como se describió en los pasos 9-14.

23. Resuspenda el pellet en 11 μ l de agua libre de nucleasa.

24. Pipetee 1 μ l de la solución resuspendida en 49 μ l de búfer TE (50:1). Estime la concentración de DNA separando 10 μ l de la

muestra diluida, usando el marcador de fragmentos λ DNA-HindIII por electroforesis a través de un gel de agarosa al 1% que contenga 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de bromuro de etidio. Es importante confirmar el tamaño y rendimiento del fragmento de DNA digerido. ***Punto de pausa.** La solución de DNA puede ser almacenada a -80°C hasta uso posterior.

2.2 Transcripción y purificación del RNA

25. Transcriba el RNA con el kit MEGAscript. Primero, combine los reactivos como se indica:

Reactivo	Cantidad
Templado de DNA linear	2-4 μl (500 ng a 1 μg)
ATP	2 μl
CTP	2 μl
GTP	2 μl
UTP	2 μl
Búfer de reacción	2 μl
Enzima	2 μl
Agua libre de nucleasas	4-6 μl
Volumen total	20 μl

26. Incube por 3-7 h a 37°C .

27. Añada 1 μl de DNase (kit). Incube por 15 min a 37°C .

28. Añada 115 μl de agua libre de nucleasas y 15 μl de solución stop (kit).

29. Añada 100 μl de agua libre de nucleasas y purifique el RNA con 750 μl de TRIzol LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

30. Resuspenda el pellet de RNA en 11 μl de agua libre de nucleasas.

31. Diluya 1 μl de la solución de RNA con 19 μl de agua libre de nucleasas. Después de desnaturalizar por 5 min a 65 °C, confirme el tamaño del RNA sintetizado, separando por electroforesis, junto con un marcador de peso de RNA, a través de un gel de agarosa 1% que contenga 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de bromuro de etidio. Determine la concentración de RNA por espectrofotometría. Es importante confirmar que el tamaño y rendimiento del RNA purificado son apropiados. ***Punto de pausa.** La solución de RNA puede ser almacenada a – 80°C por pocos meses. Evite ciclos de congelación y descongelación.

2.3 Transfección (DMRIE-C)

32. Prepare células Huh 7, o las líneas celulares permisivas Huh7.5 o Huh 7.5.1. Tratar con tripsina las células y siembre 700, 000 células en placas de 6 cm.

33. Al día siguiente lave las células con OptiMEM y combine los reactivos como se indica:

Reactivo	Cantidad
RNA JFH1	5-10 μl (5 μg)
DMRIE-C	20 μl
OptiMEM	2 ml

34. Añadir la mezcla de transfección a la placa con células. Incubar por 4 h, dentro de la incubadora.

35. Transcurrido el tiempo, lave las células con medio de cultivo regular. Las células deberán ser cultivadas cada 2-3 días de acuerdo a su confluencia.

2.4 Colección del HCV generado

36. Colectar el medio de cultivo 72 h después de la transfección y añadir medio fresco, repetir la colección del medio 2-3 días después del pasaje hasta que la producción de virus disminuya. Monitorear la expresión del virus por qPCR o Western blot.

37. Remueva el detrito celular por centrifugación a baja velocidad (20 min a 1,000 g).

38. Pasar el medio de cultivo a través de una unidad de filtrado 0.45 μm .

39. Almacenar a 4 °C (no mas de 15 días) o a – 80°C, evitar ciclos de congelación y de descongelación.

3. Retrotranscripción (RT-MMLV).

Una vez realizada la extracción del RNA total, éste fue sujeto a retrotranscripción utilizando la enzima MMLV. Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

RNA total de células en monocapa		RNA total viral	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Random primer 10X	1 μ L	Primer D2 10 μ M	1 μ L
RNA	5 μ L	RNA	5 μ L
Agua DEPC	6.5 μ L	Agua DEPC	6.5 μ L
Volumen total	11.5 μL	Volumen total	11.5 μL

Una vez preparada esta primera mezcla, se introdujeron los tubos al termociclador para incubarlos a 72 °C durante 10 minutos. Mientras tanto, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Buffer RT 5X	4 μ L
DTT 0.1 M	2 μ L
RNAse out	0.5 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
RT-MMLV 200U/mL	1 μ L
Volumen total	8.5 μL

Transcurrido el tiempo de incubación de los tubos en el termociclador, se incubaron durante 3 minutos en hielo y se añadieron los 8.5 μ L de la segunda mezcla de reacción por cada tubo. Posteriormente se continuó con el siguiente programa en el termociclador:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	25 °C	10 minutos
2	37 °C	60 minutos
3	94 °C	5 minutos
4	4 °C	10 minutos

Terminado el programa, los tubos se retiraron del termociclador, se rotularon y se almacenaron a -80°C.

4. Equipos utilizados

4.1 Uso general

- Centrífuga clínica. Marca Thermo Scientific. Modelo IEC-CLR30R.
- Centrífuga refrigerada. Marca Heraeus. Modelo Biofuge Primo R.
- Microcentrífuga. Marca Eppendorf. Modelo 5415D.
- Microscopio invertido. Marca Olympus. Modelo CKX41
- Ultracongelador Revco. Marca NUAIRE. Modelo UN-6617A36.
- Pipetor Pipet-Aid XP. Marca Drummond. Modelo 4-000-101.
- Baño maría. Marca PRECISION 180.
- Micropipetas.
- Vórtex. Marca Scientific Industries. Modelo Vortex Genie 2 G-560.

4.2 Cultivo celular

- Campana de flujo laminar con filtros HEPA. Class II type A2. Marca NU AIRE. Modelo NU-425-400.
- Incubadora con fuente de CO₂. Marca NUAIRE. Modelo UN-4750.
- Bomba de presión y vacío. Marca Daigger. Cat. EF2090G.

4.3 Técnicas moleculares (extracción de proteínas, WB, extracción de RNA total, RT, PCR, qPCR)

- Campana de PCR. Marca CBS Scientific Co. Modelo P-036-02.
- Termociclador para retrotranscripción. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.
- Termociclador para PCR punto final: Marca Eppendorf. Modelo Mastercycler gradient.
- Termociclador de tiempo real: Marca Applied Biosystems. Modelo ABI PRISM 7000.
- Micropipetas automáticas de 10 y 200 µL. Marca Rainin.
- Fotodocumentador UVP Mini Darkroom. Marca UVP. (Cambridge, UK) Modelo M-26E.
- Espectrofotómetro NanoDrop. Marca Thermo Scientific. Modelo Nanodrop 2000.

- Cámara de electroforesis. Marca Owl. Modelo B1A.
- Fuente de poder. Marca Bio Rad. Modelo Power Pac 100.
- Horno de micro-ondas. Marca Panasonic.

5. Soluciones

5.1 Extracción de proteínas

5.1.1 Buffer de lisis 5X

5 mL Triton x-100 (5% final)

5 mL Tris-HCl 1M pH7.5 (50 mM final)

12.5 KCl 2M (250 mM final)

1 mL MgCl₂ 1M (10mM final)

*ajustar volumen a 100 mL con agua

5.1.2 Buffer de lisis 1X

100 μ L buffer 5X

1 μ L DTT

1 μ L PMSF

20 μ L inhibidor de proteínas

Cbp 500 μ L agua estéril

5.2 Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

5.2.1 Buffer de carga (8mL)

4.7 mL Agua

0.5 mL Tris-HCl 1M pH6.8 (62.5 mM final)

0.8 mL glicerol (10% final)

1.6 mL SDS 10% (2% final)

0.4 mL B-mercaptoetanol (5% final)

Punta de la espátula Azul de bromofenol (0.001%)

5.2.2 Buffer de corrida (250 mL)

22.7 g Tris

0.5g SDS

210 agua

*ajustar pH 8.8 con HCl y ajustar volumen a 250 mL

5.2.3 Buffer concentrador (250 mL)

7.57g Tris

0.5 g SDS

225mL agua

*ajustar pH 6.8 con HCl y ajustar volumen a 250mL

5.2.4 Buffer de Stripping (150 mL)

1.05 mL B-mercaptoetanol

30 mL SDS 10%

9.38 mL Tris 1M

109.57 mL agua

5.3 Western blot

5.3.1 Buffer de transferencia 5X (1L)

15.1 Tris 25mM

94 g Glicina 250 mM

50 mL SDS 10% (final 0.1%)

cbp 1L agua

5.3.2 TBS (Solución salina con buffer Tris)

2.4 g Tris

8.0 g NaCl

950 mL agua

* Ajustar pH 7.6 con HCl y ajustar volumen a 1000 mL

5.3.3 Solución de bloqueo (10%)

10 g leche descremada

cbp 100 mL buffer TBS

5.4 Sistema de Infección

Para la producción de partículas virales infecciosas del VHC también se utilizaron los siguientes reactivos : Proteinase K cat. 25530-049 (Invitrogen), RNA ladder Cat. N03625 (NEB), Nuclease free water cat. 9938 (Ambion).

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jose Angel Merino Mascorro, candidato para el grado de Doctor en Ciencias en el programa de Biología Molecular e Ingeniería Genética de la Facultad de Medicina, UANL

Tesis: **ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) EN LA REGULACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)**

Campo de Estudio: Ciencias de la salud

Biografía:

Nacido en la delegación Miguel Hidalgo, Distrito Federal el 27 de Junio de 1983, hijo de Irma Alicia Mascorro Elizondo y Jose Angel Merino Arellano.

Educación:

Maestro en Ciencias con orientación en Farmacia por la Facultad de Ciencias Químicas, UANL (Agosto 2007- Julio 2009).

Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Ciencias Químicas, UANL (Enero 2001- Julio 2006)

Experiencia Profesional:

Realizó una estancia de Doctorado en el Instituto Lady Davis, Hospital General Judío-Universidad de McGill (Septiembre 2011- Septiembre 2012).

Anteriormente, profesor por horas en la carrera de QFB, en la Facultad de Ciencias Químicas, UANL (Agosto 2009 – Julio 2010).

Contacto: merino_qfb@hotmail.com