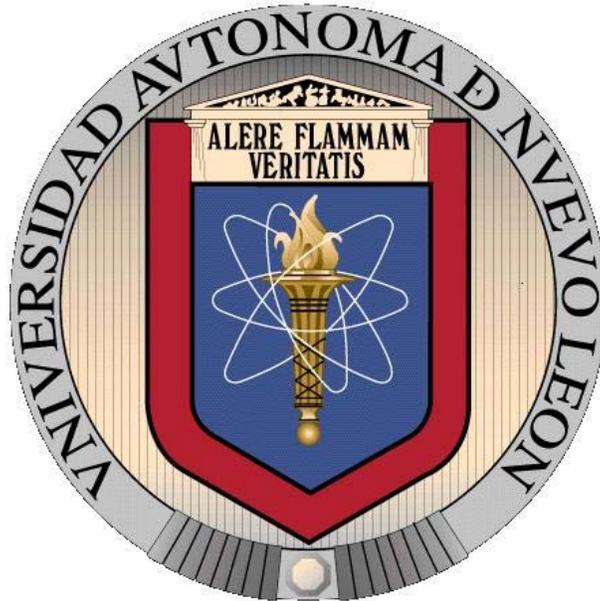


---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN LA REGULACIÓN  
NEGATIVA DE LA EXPRESIÓN DE EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)  
INDUCIDA POR ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO (AAS)**

**Por**

**MC. CLARA PATRICIA RÍOS IBARRA**

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

**Enero 2011**

---

---

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), en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS y en el Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias de la Salud de la UANL, bajo la Dirección de la Dra. Ana María Rivas Estilla y la co-dirección de la Dra. Rocío Ortiz López, Dr. Augusto Rojas Martínez, Dra. Linda Muñoz Espinosa y Dra. Paula Cordero Pérez.

---

---

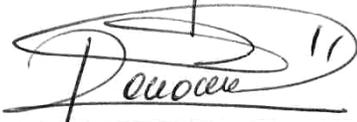
**"EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN LA REGULACIÓN  
NEGATIVA DE LA EXPRESIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)  
INDUCIDA POR EL ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO (AAS)"**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA**  
Director de Tesis



---

**DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ**  
Comisión de Tesis



---

**DRA. LINDA ELSA MUÑOZ ESPINOSA**  
Comisión de Tesis



---

**DRA. PAULA CORDERO PÉREZ**  
Comisión de Tesis



---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Comisión de Tesis



---

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

---

---

*Para Dios.*

*Para Uds. Mami y Papi: Laura Ibarra González y Héctor Manuel Ríos Valdés.*

*Para mis hermanos Laura Eugenia, Brenda Judith y Héctor Abraham.*

*Para mis abuelitos Asela Valdés Quezada y Andrés Ríos Cárdenas.*

---

---

## AGRADECIMIENTOS

- Con respeto, admiración y afecto, a mi Directora de Tesis la **Dra. Ana María Rivas Estilla**.
  
- A la Dra. Rocío Ortiz López, Dr. Augusto Rojas Martínez, Dra. Linda Muñoz Espinosa y Dra. Paula Cordero Pérez.
  
- A mi gran amigo **Arturo Quintanilla Guzmán**.
  
- A Katy, Brenda y Selene.
  
- A la Universidad Autónoma de Nuevo León.
  
- Al **Fondo SEP-CONACYT Ciencias Básicas 2006**, por el financiamiento de este proyecto: CB-2006. Estudio de la participación del estrés oxidativo en la regulación negativa del VHC inducida por ácido acetil salicílico. 27 de Julio de 2007 al 17 de Agosto de 2009.

---

---

<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
ABREVIATURAS	
<b>ÍNDICE</b>	
<b>CAPÍTULO I</b>	
1.1 RESUMEN	11
<b>CAPÍTULO II</b>	
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 VIAS DE TRANSMIÓN	14
2.2 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD	15
2.3 SISTEMA INMUNE Y VHC	19
2.4 GENOTIPOS DE VHC	20
2.5 CICLO BIOLÓGICO DEL VHC	22
2.6 INTERFERÓN- $\alpha$ Y RIBAVIRINA	24
2.7 TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL VHC	27
2.8 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL VHC	28
2.9 MODELO DE REPLICACIÓN DEL VHC <i>IN VITRO</i>	32
2.10 ACIDO ACETIL SALICÍLICO (AAS)	33
2.11 EFECTO ANTIVIRAL DE AAS SOBRE EL VHC	34
2.12 AAS Y ÓXIDO NÍTRICO	35
2.13 ÓXIDO NÍTRICO (NO)	36
2.14 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS)	37
<b>CAPITULO III</b>	
3. JUSTIFICACIÓN	42
<b>CAPÍTULO IV</b>	
4.1 OBJETIVO GENERAL	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
<b>CAPITULO V</b>	
5. ESTRATEGIA GENERAL	44

---

---

## **CAPÍTULO VI**

### **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

6.1	CULTIVO CELULAR	45
6.2	CUANTIFICACION DE NO MEDIANTE HPLC	45
6.3	RT-PCR PARA LA SEMICUANTIFICACIÓN DE iNOS	46
6.4	PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACION DE VHC E iNOS	46
6.5	WESTERN-BLOT PARA NS5A, iNOS Y PROTEINAS CON RESIDUOS DE TIROSINA NITRADOS	47
6.6	CLONACION DEL PROMOTOR DE iNOS EN pGL3-LUC+	47
6.7	TRANFORMACION DE BACTERIAS TOP 10 CON EL PLASMIDO pPRO/iNOS-LUC+	48
6.8	SELECCIÓN DE COLONIAS Y EXTRACCION DE DNA PLASMIDICO	48
6.9	CO-TRANSFECCIÓN DE pPRO-iNOS-LUC Y pCMV-RENILLA	48
6.10	ENSAYO DE LUCIFERASA PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DEL PROMOTRO DE iNOS	49
6.11	MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN	49
6.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50

## **CAPITULO VII**

### **7. RESULTADOS**

7.1	AAS INCREMENTA LOS NIVELES DE NO EN CÉLULAS Huh-7-VHC-REPLICON	51
7.2	AAS REDUCE LA EXPRESIÓN DE iNOS A NIVEL TRANSCRIPCIONAL	55

---

---

7.3 AAS ESTIMULA LA NITRACIÓN DE PROTEINAS CON RESIDUOS DE TIROSINA.	56
7.4 EFECTO DEL NO SOBRE LOS NIVLES DEL RNA DE VHC	58
7.5 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE iNOS SOBRE LA EXPRESION DE VHC	60
7.6 AAS INHIBE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE iNOS	63
7.7 FIRMA TRANSCRIPSIONAL DE HUH-7 EN PRESENCIA DE AAS	69
<b>CAPITULO VIII</b>	
8. DISCUSIÓN	75
<b>CAPITULO IX</b>	
9. CONCLUSIONES	80
<b>CAPITULO X</b>	
10. APÉNDICE	79
<b>CAPITULO XI</b>	
11. BIBLIOGRAFÍA	90

---

---

## ABREVIATURAS

<b>° C</b>	grados centígrados
<b>ug</b>	microgramo
<b>uL</b>	microlitro
<b>uM</b>	micromolar
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>dNTP's</b>	desoxinucleósidos trifosfato
<b>EDTA</b>	ácido etilen-diamino-tetra-acético
<b>h</b>	hora
<b>Kb</b>	kilobase
<b>M</b>	molar
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloruro de magnesio
<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>NaCl</b>	cloruro de sodio
<b>ng</b>	nanogramo
<b>nM</b>	nanomolar
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio

---



---

<b>seg</b>	Segundos
<b>VHC</b>	virus de la hepatitis C
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>AAS</b>	ácido acetil salicílico
<b>COX-2</b>	ciclooxigenasa-2
<b>NF-kB</b>	factor de transcripción kappa B
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>INF-<math>\alpha</math></b>	interferón- $\alpha$
<b>iRNA</b>	RNA de interferencia
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintasa inducible
<b>eNOS</b>	óxido nítrico sintasa endotelial
<b>nNOS</b>	óxido nítrico sintasa neuronal
<b>PAI-1</b>	inhibidor de activador de plasminógeno tipo-1
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	factor de crecimiento transformante- $\beta$
<b>IL-1</b>	interleucina-1
<b>IL-8</b>	interleucina-8
<b>C/EBP-<math>\beta</math></b>	protein de unión al enhancer CCAA - $\beta$ (C/EBP $\beta$ )
<b>SOD</b>	superóxido dismutasa
<b>MT</b>	Metalotioneina
<b>RR</b>	ribonucleótido reductasa
<b>CYP450</b>	citocromo P450
<b>PEG</b>	polietilen glicol

---

---

## CAPÍTULO I

### 1. RESUMEN

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.  
Facultad de Medicina.  
Universidad Autónoma de Nuevo León.

Presenta: **MC. Clara Patricia Ríos Ibarra**

**TÍTULO DEL ESTUDIO.** Evaluación del efecto del óxido nítrico (NO) en la regulación negativa de la expresión del virus de la hepatitis C (VHC), inducida por ácido acetil salicílico (AAS).

**INTRODUCCION.** Ácido acetil salicílico (AAS) disminuye los niveles del RNA del VHC en células Huh-7 (hepatocarcinoma). Se ha demostrado que AAS, en células endoteliales, modula a COX-2, MAPK, NF- $\kappa$ B, miRNAs, NO, entre otros. El NO, juega un papel importante en la defensa inmunológica. El entendimiento del mecanismo molecular involucrado en la mediación del efecto antiviral del AAS, permitirá el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Células de hepatocarcinoma Huh7-VHC-replicón fueron incubadas con AAS 4 mM, L-NIL 250  $\mu$ M o arginina 1000  $\mu$ M durante 24, 48 y 72h. Se cuantificó la producción del NO mediante HPLC. Se extrajeron el RNA y proteínas totales para medir los niveles de expresión del VHC e iNOS (óxido nítrico sintasa inducible). Por otra parte, se midió la acumulación de proteínas con residuos de tirosina nitrados, ya que sirve como marcador de estrés nitrosativo. La participación de AAS sobre la actividad del promotor de iNOS fue determinado a través de la actividad del gen reportero de luciferasa. Adicionalmente, se realizó un análisis de perfil transcripcional mediante microarreglos de expresión en células Huh7-VHC-replicón expuestas a AAS.

**RESULTADOS.** **1.** AAS incrementó la síntesis de NO. **2.** La expresión del RNA de iNOS se redujo (90%,  $p \leq 0.05$ ) en células tratadas con AAS (48h post-tratamiento). **3.** Observamos un aumento en la cantidad de proteínas nitradas (2.57 veces,  $p < 0.05$ ) en presencia de AAS. **4.** Nuestros resultados mostraron una reducción en los niveles del RNA del VHC (41%) durante el tratamiento con arginina (donador de NO) y un incremento (1.44 veces) en presencia de L-NIL (inhibidor de NO). **5.** ASA es capaz de inhibir la actividad del promotor de iNOS (58%,  $p \leq 0.05$ ). **6.** Mediante microarreglos de expresión se detectaron genes asociados a estrés oxidativo, diferencialmente expresados.

**CONCLUSIONES.** Nuestros resultados sugieren que AAS, incrementa los niveles de NO, reduce la expresión transcripcional de iNOS y aumenta la cantidad de residuos de tirosina nitrados en células Huh-7-VHC-replicón. El silenciamiento de iNOS induce la inhibición de la replicación de VHC. Estos hallazgos sugieren que NO participa en la regulación del efecto antiviral de AAS sobre la expresión del VHC. Por lo tanto, la modulación de NO a nivel farmacológico, podría proponerse como una terapia adyuvante en el tratamiento contra VHC.

---

**Dra. Ana María Rivas Estilla**

Director de Tesis

---

---

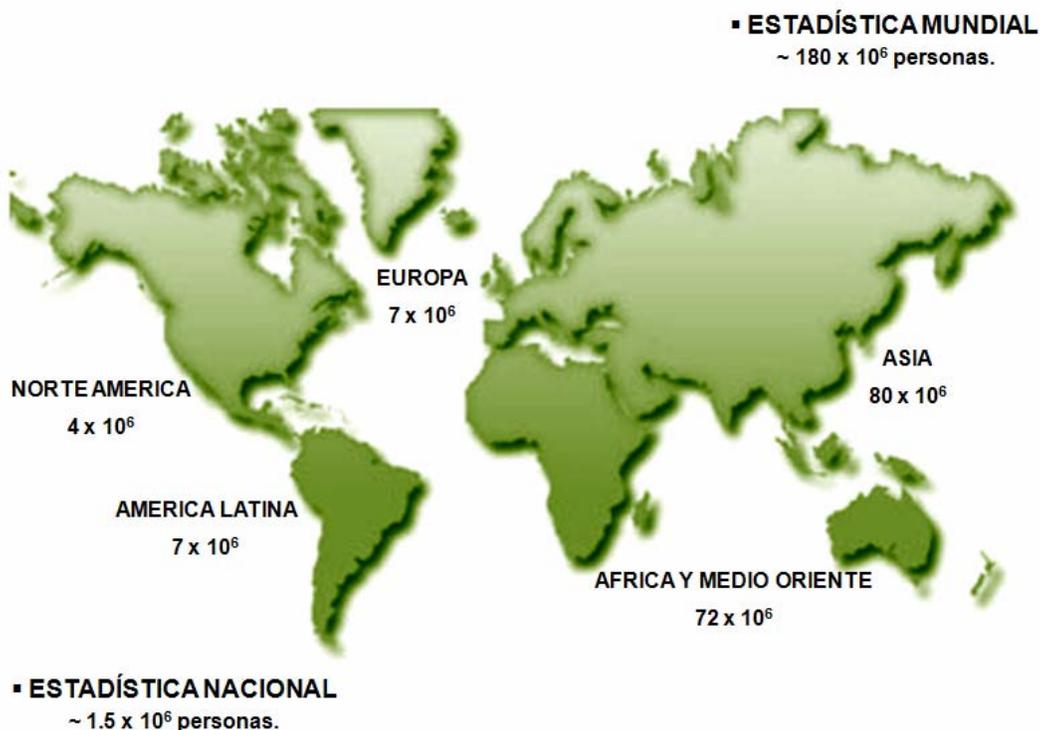
## CAPITULO II

### 2. INTRODUCCIÓN

En 1885 se reconoció por primera vez la hepatitis infecciosa aguda<sup>1</sup>. El virus de la hepatitis B fue identificado en la década de 1960<sup>2</sup> y el virus de la hepatitis A en 1973<sup>3</sup>. Después de este período, todas las otras variantes de hepatitis viral infecciosa fueron llamadas hepatitis no A y no B (NANBH). Hasta 1989 cuando fue identificado el virus de la hepatitis C (VHC)<sup>4</sup>.

En 1989, un grupo de científicos dirigidos por el Dr. Daniel W. Bradley del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) y el Dr. Michael Houghton de Chiron Corp. identificaron el VHC a nivel molecular mediante clonación y secuenciación del genoma viral<sup>5,6</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que el 3% de la población mundial está infectada con el VHC<sup>8</sup> y ~1.5 millones de individuos padecen la infección en México<sup>9</sup> (Figura 1).



**Figura 1. Distribución geográfica de VHC.** Aproximadamente 180 millones de personas están infectadas por VHC.

---

---

Actualmente, en Estados Unidos se estiman 2.7 millones de personas infectadas por el VHC; cabe señalar que la mayoría de los pacientes tienen una edad inferior a 50 años<sup>10</sup>.

En Puerto Rico se calcula una prevalencia de ~6.3%<sup>11</sup>. En Chile se ha reportado una prevalencia de 0.3% y 1.14% respectivamente<sup>12</sup>.

En los últimos años, en Europa la prevalencia general es de 1% pero varía entre los diferentes países<sup>13</sup>. En Inglaterra es de 0.72%<sup>14</sup>. En el norte de Italia la prevalencia es de 3.2% representada mayoritariamente por población anciana<sup>15-18</sup>. En Francia se estima una prevalencia de 1.3%<sup>19</sup>. En Rusia, la frecuencia registrada en donadores de sangre fué de 1.5%<sup>20</sup> y en Hungría de 0.73%<sup>21</sup>.

Estudios realizados en Egipto avalan que en donadores de sangre entre 22% y 26.6% son VHC positivos<sup>22-25</sup>, mientras que en Arabia Saudita se estima 1.8% y en Yemen 2.1%<sup>26, 27</sup>.

En Japón, 0.49% de los donadores de sangre están infectados<sup>28</sup>. En China la prevalencia reportada es de 1% entre donadores de Beijing y Wuhan<sup>29,30</sup>. En Australia se calcula que el VHC afecta a ~210,000 personas predominantemente menores de 50 años<sup>31</sup>. Existen pocos estudios en Africa; sin embargo, se ha reportado una prevalencia de 1.6% en Etiopía y 0.9% en Kenia<sup>32,33</sup>.

En nuestro país, de acuerdo con datos del Instituto Nacional de Salud Pública en el año 2010, las entidades con mayor número de casos de hepatitis C son: Baja California (n=360), Chihuahua (n=294), Estado de México (n=242), Cd. de México (n=211), Jalisco (n=204) y Sinaloa (n=186),<sup>35,36</sup>. Recientemente, el Hospital General de México realizó un estudio de prevalencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en donadores de sangre y se reportó una prevalencia de 0.16%, lo que muestra una tendencia a la baja desde 1994 (1.2%) y el 2003 (0.76%)<sup>34</sup>.

---

---

## 2.1 VIAS DE TRANSMISION

Hasta el momento, solo se considera al ser humano y al chimpancé como los únicos huéspedes naturales conocidos del VHC<sup>37</sup>. La principal vía de transmisión reconocida es la exposición parenteral con hemoderivados, aunque actualmente este concepto esta cambiando<sup>37</sup>. La introducción de técnicas de detección de anticuerpos para el VHC ha disminuido hasta límites imperceptibles el riesgo de contagio por transfusión de hemoderivados o trasplantes<sup>38</sup>.

En la actualidad se considera que el uso de drogas intravenosas es el principal factor de riesgo de infección en países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo el uso de material no estéril y las transfusiones, siguen siendo una causa importante de contagio<sup>39,40</sup>. Aunque también puede transmitirse por vía perinatal<sup>41</sup> y sexual<sup>42</sup> el riesgo de infección es bajo. La probabilidad de transmisión vertical es de 5-10% y es mayor en pacientes co-infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>43</sup>. La infección por el VHC es un hecho frecuente en pacientes infectados por el VIH, especialmente en pacientes adictos a drogas por vía parenteral<sup>44</sup>. En México, el riesgo de infección lo presentan personas que se transfundieron antes de 1993.

**1. Transmisión por transfusión sanguínea.** Antes de 1985 el principal factor de riesgo para la transmisión del VHC estaba representado por transfusión sanguínea. El desarrollo de técnicas diagnósticas como la detección y cuantificación del RNA viral, para identificar el virus en donadores de sangre y órganos, han reducido el riesgo de transmisión por esta vía<sup>45</sup>. En México, la reglamentación vigente para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, es la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993.

**2. Transmisión vertical.** La transmisión perinatal de hepatitis C ocurre aproximadamente en 5% de los niños nacidos de mujeres infectadas con VHC y está asociada con una carga viral alta al termino del embarazo y madre co-infectada con VIH (riesgo 15% a 35%)<sup>46</sup>.

---

---

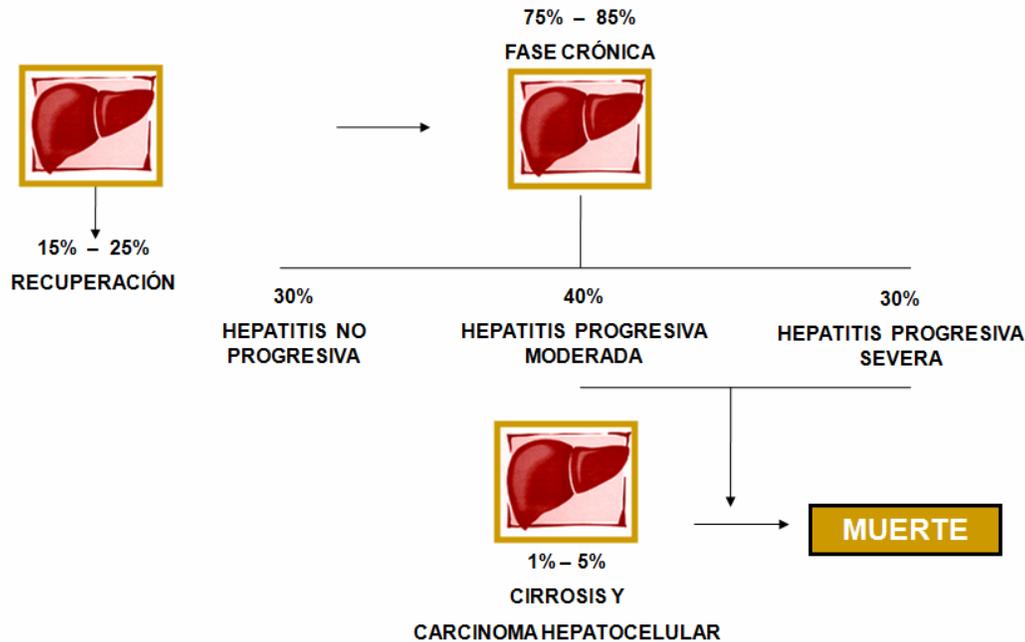
**3. La transmisión por contacto sexual.** Se considera un factor de bajo riesgo seguramente debido a la baja concentración de virus en los fluidos genitales y factiblemente por la ausencia de células blanco adecuadas en el tracto genital. La co-infección con el VIH-1 o virus del herpes simple (VHS-1) ha sido asociada con un incremento en el riesgo de transmisión<sup>47</sup>.

**4. Transmisión por farmacodependencia.** Actualmente, el uso de drogas inyectables (intravenosas), es el factor de riesgo más elevado de infección por el VHC atribuido al intercambio de agujas entre los usuarios. Entre 50% - 80% de los consumidores de drogas intravenosas contraen VHC a los cinco años posteriores al inicio del uso de drogas inyectables<sup>48</sup>.

## **2.2 HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD**

La infección por VHC pocas veces es diagnosticada en la fase aguda. La mayoría de las personas permanecen asintomáticas presentando solamente algún cuadro clínico<sup>49</sup>. Se ha descrito la presencia de hepatitis fulminante en este periodo pero es muy rara<sup>50</sup>. La infección llega a ser crónica en la mayoría de los casos, estimándose que del 75 al 85% de los pacientes presentan una viremia persistente. El intervalo entre la infección inicial y el desarrollo de cirrosis puede ser de hasta 30 años<sup>51</sup>.

En la mayoría de los casos, la infección crónica resulta en hepatitis con cierto grado de fibrosis. Puede haber complicaciones posteriores más severas como cirrosis, la cual se desarrolla en un 10 a 20% de estos pacientes<sup>52</sup>. El tiempo de cada una de las fases de la enfermedad es muy variable pero se calcula que un tercio de los pacientes desarrolla cirrosis 20 años post-infección. Una vez que la cirrosis se ha desarrollado, el riesgo de hepatocarcinoma es de 1 a 5%<sup>50</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Del 100% de los sujetos afectados del 15-25% eliminan el virus de forma espontánea; sin embargo, del 75-85% de los pacientes generan cronicidad y en la siguiente fase de la enfermedad del 10-20% de los sujetos con hepatitis crónica desarrollan cirrosis y de ellos del 1-5% carcinoma Hepatoceleular<sup>50-52</sup>.

El periodo de incubación promedio es de 6 a 7 semanas y la enfermedad clínica por lo general resulta leve y asintomática, caracterizada por elevaciones de las aminotransferasas con periodos intermitentes (incremento-descenso) y un índice alto en más del 80% de los pacientes con hepatitis crónica<sup>53</sup>. El VHC es un factor patógeno en la crioglobulinemia y en la glomerulonefritis membranoproliferativa; puede relacionarse con liquen plano, tiroiditis autoinmunitaria, sialadenitis linfocítica, fibrosis pulmonar idiopática, porfiria cutánea tardía esporádica, gammapatías monoclonales y linfoma<sup>54</sup>. La hepatitis C puede inducir resistencia a la insulina (lo cual altera el incremento de riesgo de fibrosis hepática) y el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 es mayor en pacientes con hepatitis C crónica. La esteatosis hepática es una característica particular de infección con VHC genotipo 3<sup>55</sup>.

La fibrosis hepática representa un excesivo depósito de proteínas de matriz extracelular que alteran la estructura del parénquima hepático lo que deriva finalmente en cirrosis<sup>56</sup>.

---

---

La fibrosis puede ser causada por enfermedades virales, autoinmunes, metabólicas y colestásicas. La degradación de las proteínas de matriz extracelular es dirigida por metaloproteinasas (MMPs) (enzimas proteolíticas Zn-dependientes), capaces de degradar colágeno<sup>57</sup>. El activador de plasminógeno tipo urocinasa puede activar a las MMPs durante un evento fibrinolítico. Por otra parte, el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>58</sup>, puede restringir la actividad de las MMPs al inducir la sobre-expresión del inhibidor del activador de plasminógeno tipo-1 (PAI-1)<sup>59</sup>.

La cirrosis se caracteriza por la pérdida importante de células hepáticas, colapso y fibrosis de la red de reticulina de soporte, con distorsión del lecho vascular y regeneración nodular del resto de las masas celulares hepáticas. La pérdida progresiva de células hepáticas puede producir ictericia, ascitis, edema y síndrome de insuficiencia hepática (disfunción del sistema nervioso central, caquexia, y muerte)<sup>60</sup>.

Los eventos moleculares encontrados en la cirrosis hepática incluyen acumulo de laminina  $\alpha$ -1, tenascina y fibronectina<sup>61,62</sup>, con la sucesiva activación y proliferación de células estelares hepáticas (HSC)<sup>63</sup> inducida mediante la secreción autocrina y paracrina de citocinas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Las manifestaciones clínicas se atribuyen a la disfunción hepatocelular progresiva e hipertensión portal. Conforme progresa la enfermedad, los pacientes cursan episodios de sangrado en tubo digestivo y de encefalopatía, condiciones severas que los dirige a la muerte.

La determinación de transaminasas séricas es muy útil para el diagnóstico precoz de hepatitis viral y para el control de la evolución de la enfermedad hepática; la elevación y permanencia de la actividad de transaminasas en el curso de una hepatitis sugiere cronicidad<sup>64</sup>. Las transaminasas que suelen determinarse son: aspartato amino transferasa (AST) y alanino amino transferasa (ALT).

Los valores de AST se incrementan significativamente en pacientes con necrosis hepática aguda. En caso de daño agudo y masivo los valores de esta enzima pueden elevarse hasta 100 veces con respecto al valor normal<sup>65</sup>. Pacientes con cirrosis

---

---

hepática, colestasis intrahepática o daño hepatocelular habitualmente experimentan elevaciones moderadas de AST, dependiendo del grado de necrosis. En pacientes con cirrosis hepática los valores de AST son superiores a los de ALT y el aumento de AST es entre cuatro y cinco veces el valor normal<sup>66</sup>.

La relación AST/ALT, cuyo valor normal es 0.7, aumenta a medida que el daño se hace más profundo y crónico.

Los niveles anormales de fosfatasa alcalina (FA) y las de la gamma-glutamyl-transferasa (GGT), pueden indicar cirrosis y colestasis<sup>67</sup>.

Para la detección y diagnóstico de la infección por el VHC y el seguimiento de la progresión de la enfermedad, existen ensayos serológicos e inmunoenzimáticos, principalmente Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)<sup>68</sup> y Recombinant Immunoblot (RIBA); con estas pruebas se detectan los antígenos del VHC mediante el uso de anticuerpos mono ó policlonales<sup>69</sup>.

Con herramientas moleculares es posible detectar, cuantificar y caracterizar el genoma del VHC<sup>70</sup>.

Para la detección cualitativa del RNA de VHC en suero o plasma, se determina la existencia del RNA viral mediante retro-transcripción (RT) de la región 5' UTR del genoma del VHC seguida de una doble amplificación genómica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), entre los métodos comerciales destacan Amplicor HCV y Amplicor HCV Monitor (Roche Molecular Systems)<sup>71</sup>.

La genotipificación del VHC involucra la amplificación de una región en el extremo 5' UTR y la digestión del fragmento amplificado, con enzimas de restricción que reconocen polimorfismos de un solo nucleótido (RFLP). Entre las pruebas comerciales se encuentra el ensayo de LiPA (Linear Immuno Probe Assay, Innogenetics), el cual permite la detección de los genotipos 1-6 del VHC<sup>72</sup>.

Para la cuantificación del virus circulante (carga viral) en suero o plasma, la prueba más sensible es PCR en tiempo real ya que permite cuantificar hasta 50 copias del virus por cada mililitro de sangre. La única prueba de carga viral aprobadas por la FDA es Amplicor para VHC (Roche)<sup>73</sup>.

---

---

## 2.3 SISTEMA INMUNE Y VHC

La inmunidad humoral juega un papel importante en la eliminación del VHC<sup>74</sup>. Por otra parte, la inmunidad celular produce una respuesta policlonal poco intensa. Sin embargo, incrementa la respuesta proliferativa de CD4+ generando un perfil de citocinas Th1 dirigidas contra antígenos del VHC en individuos que resuelven la infección<sup>75</sup>.

El VHC a nivel hepático provoca una respuesta inmunológica generalizada que se caracteriza por la producción de IFN- $\gamma$  y posterior reclutamiento de leucocitos en el hígado con formación de folículos linfáticos y potenciación de las rutas de procesamiento y presentación antigénica<sup>76</sup>. Todas estas células linfoides son grandes productoras de citocinas tanto Th1 como Th2 capaces de dirigir la eliminación del VHC<sup>77</sup>.

En respuesta a la infección viral, múltiples vías de señalización se activan participando en la regulación de genes relacionados con fenómenos inflamatorios, como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)<sup>78</sup>. La expresión de COX-2 se encuentra incrementada en diversos cánceres, incluyendo el colorrectal, pancreático, gástrico, pulmonar y de cabeza y cuello<sup>79</sup>. Recientemente se ha relacionado la presencia de COX-2 con el hepatocarcinoma en pacientes VHC positivos. Las citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13 así como los glucocorticoides disminuyen la inducción de COX-2<sup>80</sup>.

La inducción del gen COX-2 depende del tipo celular y del estímulo molecular que puede ser dirigido por la proteína cinasa C, cinasa A y la vía de activación de la proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK)<sup>81</sup>. Estudios de su regulación transcripcional han demostrado la implicación del sitio CRE (elemento de respuesta a AMP cíclico), del factor de transcripción AP-1 y del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)<sup>82</sup>. El aumento de COX-2 se traduce con un aumento de PGE2 que es uno de los más importantes moduladores de la función inmune<sup>9</sup>. Previos estudios han demostrado que la COX-2 y la PGE2 modulan la replicación de virus como CMV y hepatitis B<sup>83-85</sup>.

---

---

La función citotóxica del sistema inmune frente al VHC se modula primordialmente por los linfocitos T citotóxicos (CTL), células de citotoxicidad natural (NK) y células T con restricción para CD1d (NKT)<sup>86</sup>. Durante la infección por VHC, la función de estas células se encuentra alterada y puede condicionar la progresión de la enfermedad. Además, la existencia de una buena respuesta CD8+ específica en pacientes con infección crónica se asocia con niveles mas bajos de viremia-VHC<sup>87</sup>. También, el número y la actividad de las células NK y NKT están alterados durante la infección crónica y pueden recuperarse con el tratamiento antiviral. Estas células NK y NKT participan en la respuesta inmune innata para eliminar las células infectadas por el VHC<sup>88</sup>. Además, la evidencia sugiere que estas células son responsables del inicio de la respuesta inmune adaptativa y la regulación de la respuesta autoinmune<sup>89</sup>.

## 2.4 GENOTIPOS DE VHC

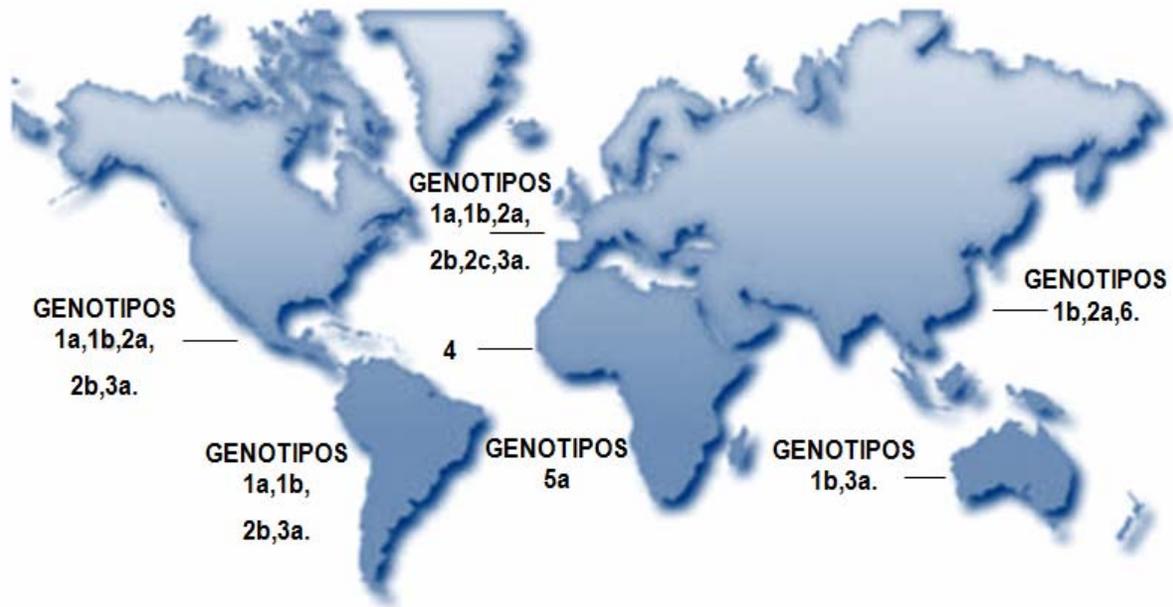
El VHC tiene una gran heterogeneidad genómica debido a la elevada replicación viral y la baja fidelidad de la transcriptasa reversa (la tasa de error es de 1 nucleótido por cada 200 incorporados en la replicación)<sup>90</sup>. La heterogeneidad genética puede ser clasificada en cuatro niveles, dando lugar a tipos, subtipos, aislados y cuasiespecies<sup>91</sup>.

El grado de homología inter-genómica da lugar al genotipo, en el cual, si existe homología del genoma entre 66-69%, se le llama *tipo* y se designa con número arábigo (la nomenclatura actual solo incluye la numeración del 1 al 6, por lo que los genotipos antiguamente nombrados 7,8,9 y 11 fueron reclasificados como 6 y el genotipo 10 como el 3)<sup>92</sup>. Dentro de un mismo tipo, si la homología es de 77-80%, se clasifica en *subtipo* designándose con una letra después del número del genotipo (a, b, c, d, e, f, g y h, principalmente); si dentro de un mismo subtipo existe una homología de 81-90% se denominan *aislados*<sup>93</sup>. En cambio el grado de homología intra-genoma de 91-99% da lugar a *cuasiespecie* que es el resultante de la acumulación de las mutaciones durante la replicación viral en un individuo<sup>94,95</sup> (Tabla 1).

TERMINOLOGIA	HOMOLOGIA	DEFINICION
<b>TIPO</b>	66-69%	Heterogeneidad entre virus.
<b>SUBTIPO</b>	77-80%	Virus relacionados dentro de cada tipo.
<b> AISLADO</b>	81-90%	Especies del mismo subtipo en diferentes pacientes.
<b>CUASIESPECIES</b>	91-99%	Variantes genéticas en un individuo

**Tabla 1.** Clasificación genética del VHC.

La frecuencia de los diversos genotipos varía de un país a otro y se han encontrado diferencias importantes en cada región; los genotipos 1, 2, y 3 tienen distribución mundial, pero sus prevalencias relativas varían de un área geográfica a otra<sup>96</sup>. Los subtipos 1a y 1b son los más frecuentes en Estados Unidos, Europa y Japón; los subtipos 2a y 2b son relativamente comunes en Estados Unidos, Europa y Japón; el genotipo 2c es frecuente en el Norte de Italia; el genotipo 3a tiene una relación con las drogas de abuso en Europa y Estados Unidos<sup>100</sup>. El genotipo 4 es prevalente en África<sup>97</sup> y Medio Oriente; los genotipos 5 y 6 se han observado en Sudáfrica y Hong Kong, respectivamente; los genotipos 7, 8 y 9 han sido identificados únicamente en pacientes vietnamitas; el 10 y 11 en pacientes de Indonesia<sup>98</sup>. Aunque los genotipos del VHC pueden ser en parte un predictor independiente de la respuesta a la terapia con interferón, es más probable que los sujetos con genotipos 2 y 3 tengan una respuesta favorable al tratamiento que aquellos infectados por el genotipo 1a ó 1b<sup>99</sup> (Figura 3). Por lo anterior, la genotipificación de VHC es de gran utilidad en estudios como transmisión del virus, epidemiología molecular, patogénesis, ensayos de diagnóstico, historia natural y tratamiento de la infección.



**Figura 3.** Actualmente se conocen 6 diferentes genotipos de VHC, clasificados a su vez en un número variable de subtipos y cuasiespecies<sup>92-99</sup>.

En México, en los últimos 13 años diversos estudios han reportado una mayor prevalencia del genotipo 1 (subtipos a y b), seguido del genotipo 2 (subtipos a, b y c) y en muy baja proporción se han reportado los genotipos 3 y 4<sup>101-103</sup>. En un estudio realizado en el 2008 en nuestro país la frecuencia de los genotipos reportada fue la siguiente: 58.3% tipo 1, 30.5% tipo 2, 8.7% tipo 3, 1% tipo 4, 1.5% tipos mixtos. La frecuencia de subtipos fue: 1b 26.8%, 1a 21.3%, 2a/ 2c 12.4%, 2b 9.2%, 3a 8.4%. La distribución de los genotipos por zonas en el país fue: Norte (n = 43): 1b 46%, 1a 18.6%, 2a/ 2c 9.3%, 2b 7%; Occidente y Bajío (n = 345): 1b 24.1%, 1a 20.9 %, 2a/2c 13.3%, 2a 9.6%, 3a 9.6%; Centro y Sur (n = 15): 1a 40%, 1b 33%, 1a/1b 20%, 2b 7%<sup>104</sup>.

## 2.5 CICLO BIOLÓGICO DEL VHC

El VHC se replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos, pero también es capaz de infectar a otras células como las células dendríticas<sup>105</sup> y células B<sup>106</sup>. En el

---

---

suero, el VHC se puede encontrar libre, unido a inmunoglobulinas o asociado a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL)<sup>107</sup>.

Tras la posible endocitosis mediada por receptor se produciría la fusión de la envoltura viral con la membrana de los endosomas en un proceso mediado por glicoproteínas de la envoltura y dependiente del pH<sup>108</sup>. Las glicoproteínas de la envoltura viral son capaces de unirse a múltiples proteínas de membrana que podrían servir como receptores<sup>109</sup>. Entre estas proteínas se encuentra el receptor de LDL, el receptor clase B tipo I (SR-BI)<sup>110</sup>, ocludinas (OCLN), claudinas-1,6,9 (CLD) y la tetraspanina (CD81)<sup>111,118</sup>. Las proteínas E1-E2 del VHC, contienen sitios de unión para los receptores CD81, CLD y OCLN los cuales se expresa en hepatocitos y linfocitos B<sup>112</sup>.

Una vez en el citoplasma, el genoma viral se traduce generando la poliproteína viral en un proceso independiente de Cap y que requiere de la unión al ribosoma 40S al sitio de internalización a ribosomas (IRES) en la región 5'-UTR, proceso que en la región 3'-UTR podría tener un papel regulador<sup>113</sup>.

La replicación del RNA viral es dirigida por la enzima RNA polimerasa viral dependiente de RNA (NS5B), que origina cadenas de RNA con polaridad negativa que servirán como molde para la síntesis de cadenas de RNA con polaridad positiva (marco de lectura abierto); los copias de RNA viral tienen una simetría de 10:1 (cadena positiva:cadena negativa)<sup>114</sup>. Es importante destacar que el virus no genera lisis celular ni se integra al genoma de la célula huésped<sup>115</sup>.

El procesamiento de la lipoproteína viral por proteasas celulares y del virus, genera las proteínas virales maduras que junto al RNA viral y factores celulares forman un complejo membranoso de replicación peri-nuclear<sup>116</sup>. La formación de nuevas partículas virales comienza con la interacción del RNA genómico y las proteínas de la cápside para formar la nucleocápside que luego se recubrirá de la envoltura y finalmente las partículas virales maduras e infecciosas serán exportadas por exocitosis<sup>117</sup> (Figura 4).

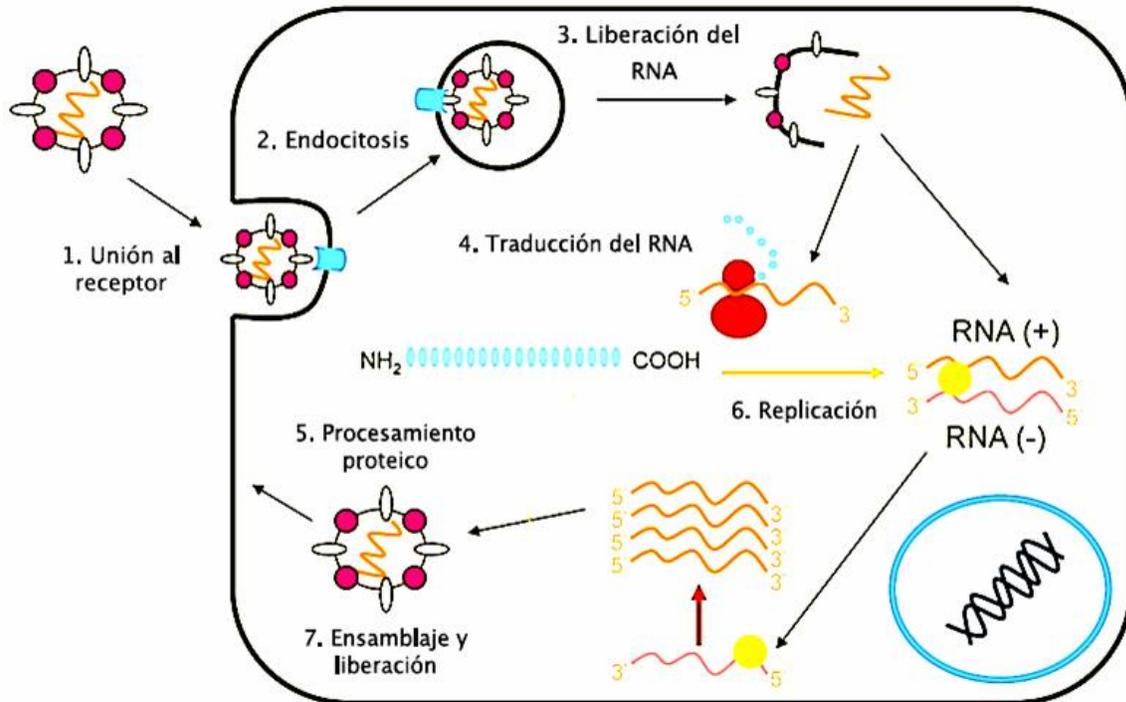
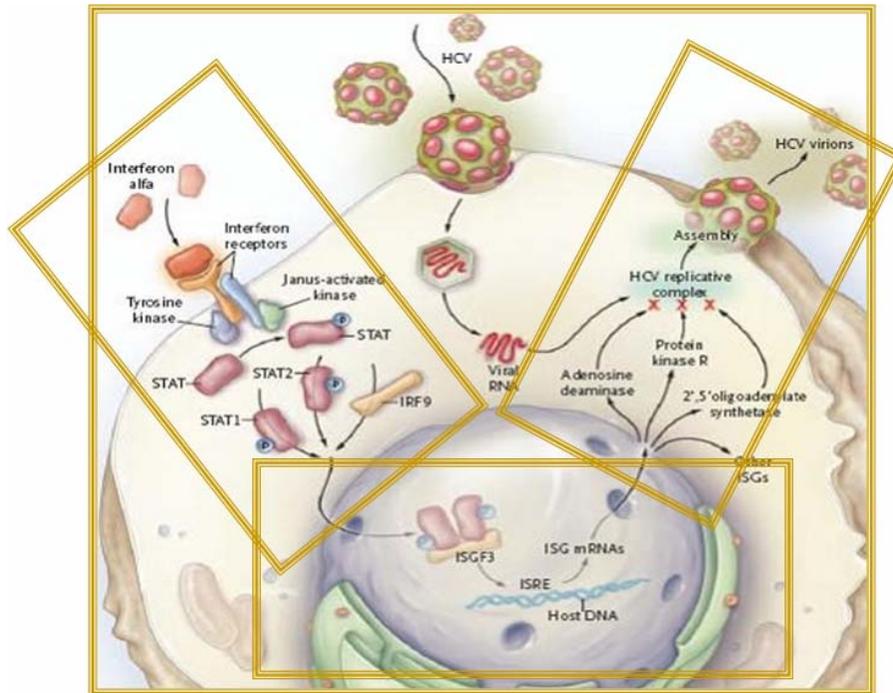


Figura 4. Esquema del ciclo replicativo de VHC<sup>114-117</sup>.

## 2.6 INTERFERÓN- $\alpha$ (INF- $\alpha$ ) Y RIBAVIRINA

Actualmente, el INF- $\alpha$  y ribavirina, representan la mejor terapia disponible para el tratamiento contra el VHC; desafortunadamente, únicamente el 50% de los pacientes con genotipo 1 presentan una respuesta viral sostenida (RVS), mientras que el 85% de los pacientes con genotipo 2 ó 3 tienen RVS<sup>120</sup>.

El INF- $\alpha$  es una citocina, con una importante función en la respuesta inmune innata antiviral<sup>121</sup>. Los receptores de INF- $\alpha$ , activan la vía de señalización JAK-STAT cinasa, provocando la transducción de señales sobre activadores transcripcionales, que dirigen la expresión de múltiples genes inducidos por INF- $\alpha$ . Estos genes incluyen RNAsas de doble cadena, inhibidores de la traducción y proteínas desestabilizantes del RNAm viral, cuya función final es impedir la replicación de los virus infectantes (Figura 5)<sup>120,122</sup>.



**Figura 5.** El INF- $\alpha$  activa la vía de señalización JAK-STAT. El INF- $\alpha$  induce la fosforilación de JAK y esta a su vez fosforila al dímero STAT 1-2 el cual forma un complejo con IRF9 (factor de respuesta a interferón-9) que se transloca a núcleo para dirigir la transcripción de genes con efecto adverso sobre el ciclo biológico de VHC.

Desde 1991, la administración del INF- $\alpha$  fue aprobado como terapia contra el VHC; sin embargo, la monoterapia con INF- $\alpha$ , genera solo una tasa de curación entre 10 y 12%; pero al combinar INF- $\alpha$ <sup>123</sup> y ribavirina, la tasa de respuesta virológica es del 40%<sup>124</sup>. La ribavirina es un análogo de nucleósido con actividad antiviral e inmunomoduladora. ribavirina reduce el nivel de transaminasas en pacientes con hepatitis C crónica, pero no modifica la viremia ni la histología hepática por lo que su uso como monoterapia fue descartada<sup>123</sup>.

**2.6.1 INTERFERÓN- $\alpha$  PEGILADO (INF- $\alpha$ -PEG).** El INF- $\alpha$ -PEG es una presentación farmacológica del interferón que se obtiene mediante la unión fisicoquímica de una molécula de interferón alfa recombinante a una molécula de polietilén glicol<sup>125</sup>. La conjugación de proteínas con polietilén glicol es un método que logra retrasar su aclaramiento, prolongar y mantener su actividad y en consecuencia, mejorar su eficacia<sup>126</sup>. El compuesto resultante es muy estable y tras su administración por vía

---

---

subcutánea, se produce una liberación rápida del interferón pero su eliminación es lenta, de manera que se consiguen picos de concentración prolongados, durante al menos 90 horas, con una fase de eliminación gradual a lo largo de varios días<sup>127</sup>. Estudios en primates han mostrado una disminución del aclaramiento renal del INF- $\alpha$  -PEG que determina que su vida media sea mucho más prolongada que la del interferón estándar<sup>128</sup>. Gracias a ello, se consigue que la acción del interferón se mantenga de forma ininterrumpida durante un período de tiempo mucho más largo, con lo que se obtiene un efecto terapéutico sostenido con una sola inyección semanal a diferencia del interferón convencional (tres veces por semana)<sup>127</sup>.

La eficacia de la monoterapia con INF- $\alpha$  -PEG se aproxima a la de la combinación con interferón convencional mas ribavirina<sup>129</sup>.

Al igual que en el tratamiento convencional, la infección por virus con genotipo distinto al 1 y la baja viremia se asocian a una mayor tasa de respuesta al INF- $\alpha$  -PEG<sup>130</sup>.

El tratamiento combinado, sobre todo si el perfil virológico del paciente exige un tratamiento prolongado, tiene un costo muy elevado y la tolerancia al tratamiento no es buena en algunos casos. Por ello está justificado intentar identificar los pacientes en quienes puede anticiparse el fracaso del tratamiento y puede por lo tanto, estar justificada la interrupción precoz del mismo<sup>130</sup>. El procedimiento más apropiado para tomar esta decisión se basa en el control de la evolución del RNA-VHC, utilizando una técnica de alta sensibilidad (RT-PCR), a las 4, 12 y 24 semanas de tratamiento. Si el RNA-VHC es positivo a las 24 semanas, la probabilidad de obtener una respuesta anti viral sostenida es mínima (2%), por lo que la interrupción del tratamiento está justificada<sup>131</sup>. Si a las 12 semanas el RNA-VHC aún se mantiene positivo, la probabilidad de obtener una respuesta sostenida prolongando el tratamiento hasta las 48 semanas es del 10%, por lo que en estos pacientes puede estar justificado retrasar la decisión de suspender el tratamiento hasta conocer el resultado de la determinación del RNA-VHC tras 24 semanas de tratamiento<sup>132</sup>.

---

---

## 2.7 TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL VHC.

Actualmente se están diseñando nuevas estrategias para combatir la infección por VHC<sup>133</sup>.

La inhibición farmacológica de la proteasa NS3 y de la RNA polimerasa NS5A del VHC son los blancos farmacológicos de la mayoría de los principios activos actualmente en desarrollo<sup>134</sup>. Los inhibidores de la proteasa actúan inhibiendo el centro catalítico del enzima serin-proteasa NS3, mediante enlace covalente (telaprevir, boceprevir)<sup>135,136</sup> o no covalente (R7227, BILN2061), lo que impide la maduración de las proteínas no estructurales de la poliproteína y la formación del complejo de replicación<sup>137</sup>.

Los inhibidores de la polimerasa son el otro gran grupo de fármacos contra el VHC en desarrollo<sup>138</sup>. Se subdividen en análogos de nucleósidos, que producen inhibición al terminar precozmente la elongación de la cadena RNA-VHC (+) en el centro catalítico de la polimerasa NS5, necesitan tri-fosfatización para ser activos y en no análogos de nucleósidos que actúan en una región alejada del centro catalítico y producen inhibición alostérica de la actividad del enzima<sup>139</sup>.

El poder antiviral de los inhibidores de la proteasa es mayor que la de los inhibidores de la polimerasa, sin embargo, su barrera genética (número de mutaciones del VHC para originar resistencia al fármaco) es mas baja, mientras que la capacidad antiviral de los inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósido, es mas baja que los no análogos, pero su barrera genética es mayor que la de estos últimos<sup>140</sup>. Por lo tanto, los inhibidores de polimerasa no análogos de nucleósidos, al igual que los inhibidores de la proteasa tienen una barrera genética baja y una sola mutación confiere resistencia al fármaco<sup>141</sup>.

El tratamiento con telaprevir o boceprevir de pacientes que han fracasado a tratamientos previos han producido resultados alentadores, ya que pacientes no respondedores con tratamiento previo responden en un 53% con telaprevir (24 semanas mas otras 24 con terapia convencional)<sup>142</sup> y en un 55% con inducción con terapia convencional 4 semanas y posteriormente triple terapia con boceprevir 44 semanas adicionales<sup>143</sup>. En estudios en fase II en humanos, al combinar el tratamiento de de INF- $\alpha$  mas ribavirina con telaprevir o boceprevir, la RVS en paientes con genotipo 1, puede incrementarse hasta 85%<sup>244</sup>.

---

---

Danoprevir (Roche), es un inhibidor de la actividad de la proteasa NS3/4A del VHC. Actualmente, se encuentra en la fase II de desarrollo clínico. Ha mostrado una gran eficacia inicial contra el VHC como monoterapia, combinado con RG7128 y combinado con Pegasys y Copegus (ribavirina). Además, ha presentado en dichos estudios un buen perfil de seguridad y tolerabilidad<sup>144</sup>.

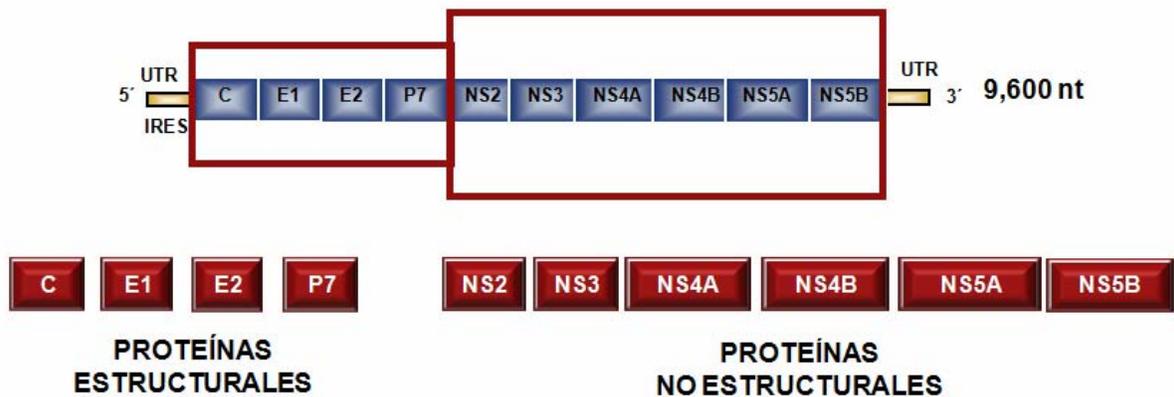
Durante la reunión anual de la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD), la compañía Boehringer Ingelheim mostró los resultados de un ensayo que involucra la combinación de dos compuestos orales: el inhibidor de la proteasa BI 201335 y el inhibidor de la polimerasa BI 207127, junto con ribavirina y observaron que la combinación reduce la carga viral hasta un límite inferior a los niveles cuantificables en pacientes no sometidos a tratamiento previo para el VHC<sup>145</sup>.

## **2.8 ESTRUCTURA MOLECULAR DE VHC**

El genoma del VHC está constituido por una cadena sencilla de RNA con polaridad positiva con una longitud entre 9,500-10,000 nucleótidos (9.6 kb), que codifica para una poliproteína de aproximadamente 3,010 aminoácidos caracterizada por un alto grado de heterogeneidad genética y con un único marco de lectura abierto (ORF)<sup>146</sup>.

El genoma alberga en sus extremos secuencias no codificantes (UTR). El extremo 5'-UTR está conformado por 361 bases altamente conservadas y resistentes a la desnaturalización. El extremo 3'-UTR contiene 230 bases con una secuencia de poli(A)<sup>147</sup>.

La poliproteína es procesada a través de proteasas virales y celulares para la generación de 10 proteínas funcionales. La porción amino terminal forma las proteínas estructurales y se divide en cuatro (core, E1, E2, p7), mientras que fracción carboxilo terminal da lugar a seis proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)<sup>148,179,180</sup> (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura genómica de VHC. Un único marco de lectura abierto contenido en VHC, codifica para una poliproteína de la cual derivan 4 proteínas estructurales (S) y 6 no estructurales (NS)<sup>146-148</sup>.

**EXTREMO 5' NO TRADUCIBLE (5'-UTR).** El extremo 5' del genoma está compuesto por una región no codificante, comprendida entre los nucleótidos 1-342<sup>149</sup>. Es altamente conservada entre aislamientos del mismo grupo (98%) y entre aislamientos de diferentes grupos (93%) y está implicada en la regulación de la replicación del genoma viral y en la traducción génica<sup>150</sup>.

**PROTEÍNAS ESTRUCTURALES (S).** La proteína del core (C), de 16-22 kDa, se localiza entre los nucleótidos 342-915<sup>151</sup>. Esta proteína es responsable de formar la nucleocápside y presenta alto contenido de aminoácidos básicos (arginina y lisina) en su extremo amino y un epítipo inmunodominante localizado en la región N-terminal<sup>152</sup>. Es la región estructural más conservada y contra la que mayor reactividad global se ha encontrado en los sueros de portadores, de ahí su importancia como componente de los sistemas diagnósticos.

La glicoproteína de la envoltura del virión (E1), de 32-35 kDa, está comprendida entre los nucleótidos 915-1491<sup>153</sup>. Se han localizado al menos 2 epítipos antigénicos potenciales, entre los aminoácidos 210-233 que es una secuencia variable y entre 315-327 que es un dominio altamente conservado. El extremo carboxílico es hidrofóbico y posee dos secuencias homólogas a segmentos trans-membranales<sup>154</sup>.

La glicoproteína de la envoltura (E2/NS1), de 58-72 kDa, se localiza entre los nucleótidos 1491 y 2769. Esta proteína contiene 11 sitios de glicosilación. Entre los

---

---

residuos 484-499 y 554-569 tiene dos regiones antigénicas altamente conservadas entre los diferentes tipos de VHC<sup>155</sup>. El peso molecular varía, debido a que la proteína presenta dos tipos de procesamiento, en uno la proteína se mantiene intacta (del aminoácido 384 al 810) y en el otro se produce un corte por una peptidasa entre los aminoácidos 746 y 747, que da lugar a una E2 truncada y a una proteína denominada p7<sup>156</sup>.

Las glicoproteínas (E1 y E2) juegan un papel importante en la patofisiología del virus<sup>157</sup>. El análisis genómico de todos los VHC aislados revelan que ambas se caracterizan por una marcada variabilidad, incluso dentro de un mismo individuo, especialmente en dos subregiones hipervariables localizadas en la región E2/NS1<sup>158</sup>. Cuando se expresan juntas en vectores virales, las proteínas E1 y E2 se glicosilan y forman un heterodímero, que es reconocido por la mayoría de los pacientes infectados con el virus<sup>159</sup>. Esto indica que este heterodímero puede ser importante para la conformación adecuada de los epítomos antigénicos. Esta región posee un motivo estructural, entre los aminoácidos 401-406 ó 407, que es inmunogénico y conservado entre los diferentes aislamientos y que es útil para el tratamiento y diagnóstico del VHC<sup>160</sup>. En los diferentes aislamientos el porcentaje de homología de la región estructural del virus es entre 74-92%, siendo la región del núcleo la más conservada (81-88%) y la región E1, la menos conservada (53-69%)<sup>161</sup>.

**PROTEINAS NO ESTRUCTURALES (NS).** Esta región incluye proteasas con actividad helicasa y RNA polimerasa dependiente de RNA y otros factores de transcripción con función biológica desconocida<sup>162</sup>.

El proceso proteolítico de la región no estructural es mediado por dos proteasas virales: proteasa NS2-3, que rompe la unión NS2/3, y la proteasa NS3-serin-dependiente, que es la responsable de procesar los sitios NS3/NS4A, NS4A/B, NS4B/5A y NS5A/5B<sup>163</sup>.

La proteína NS2 es un polipéptido de trans-membrana de 23 kDa, ubicada entre los nucleótidos 2769-3360, con su extremo carboxilo translocado en el lumen del retículo endoplasmático y el extremo amino localizado en el citoplasma<sup>164</sup>. Posee una región muy inmunogénica y altamente conservada en los diferentes aislamientos del VHC entre los residuos 960-975. Su función no está totalmente definida, pero participa en el

---

---

ensamblaje del virión y forma parte del complejo de replicación junto con la NS5A y NS5B<sup>165</sup>.

La proteína NS3, comprendida entre los nucleótidos 3360-5313, es soluble y tiene un peso molecular de 70 kDa<sup>166</sup>. Presenta dos actividades enzimáticas, una ATPasa y helicasa, indispensable para la replicación del RNA y la otra similar a la de las proteasas dependientes de serina, que realiza cortes en *cis* y *trans*, y da lugar a un procesamiento proteolítico del resto de la región no estructural en NS4A, NS4B, NS5A y NS5B<sup>167</sup>. Presenta una secuencia de 14 aminoácidos altamente similar al sitio inhibidor de la proteína cinasa cAMP-dependiente<sup>168</sup>.

La proteína NS4 se procesa en NS4A de 8 kDa (entre los nucleótidos 5313 y 5475) y NS4B de 27 kDa (5475-6258), ambas son altamente hidrofóbicas y asociadas a la membrana. Su función no es totalmente conocida, pero se le atribuye que forma parte del complejo de replicación viral, que NS4A junto con NS3 forman un complejo con actividad proteolítica<sup>169</sup>.

Posee dos regiones de gran antigenicidad, comprendidas entre las regiones 1691-1708 y 1710-1728, altamente variables entre las diferentes variantes de VHC (los tipos 1, 2 y 3 sólo presentan una analogía de 50-60%)<sup>170</sup>.

La proteína NS5 codifica para dos proteínas, la NS5A de 56-58 kDa (6258-7602) y la NS5B de 68-70 kDa (7602-9375)<sup>171-172</sup>. NS5A actúa como factor transcripcional mientras que NS5B es una RNA polimerasa dependiente de RNA<sup>173</sup>. Su mayor antigenicidad la confieren los residuos 2284-2329 pertenecientes a NS5A y entre 2584-2599 y 2944-2959 de NS5B. Estas secuencias son variables entre los diferentes tipos del VHC. Entre los codones 2209 y 2248 de determinados subtipos hay una región resistente al tratamiento con interferón<sup>174</sup>. El porcentaje de homología de la región no estructural entre diferentes aislamientos es de 71-78%, siendo NS5 la menos conservada (56-72%)<sup>175</sup>.

**EXTREMO 3' NO TRADUCIBLE (3'-UTR).** El genoma concluye en una secuencia 3'terminal no codificante pequeña de aproximadamente 200 nucleótidos (9375-9419), rica en uridina, conservada entre los diferentes tipos del VHC e implicada en la replicación genómica<sup>179</sup>. Consta de 4 elementos: **1.** Una secuencia corta con significativa variabilidad entre genotipos. **2.** Una zona poli (U). **3.** Una región de

---

---

polipirimidinas, rica en uracilo con algunas citocinas. 4. Una secuencia de 98 bases, que forma una estructura de tallo y anillo en el extremo<sup>180</sup>.

## 2.9 MODELO DE REPLICACIÓN DE VHC *IN VITRO*

En 1999, se desarrolló una estrategia *in vitro* basada en la construcción de replicones subgenómicos de VHC, permitiendo evaluar la replicación viral bajo diversas condiciones experimentales<sup>181</sup>. En estos minigenomas del VHC (genéticamente modificados), la región que codifica las proteínas estructurales fue reemplazada por un marcador selectivo: Neomicin-fosfotransferasa (NEO) cuya proteína es capaz de inactivar el efecto citotóxico de G418 (geneticina) en las células transfectadas con el replicón subgenómico y que funge como marcador positivo de la transfección<sup>182</sup>. La expresión de NEO, esta mediada por el sitio de internalización a ribosomas (IRES) original de VHC contenido en la región 5'-ÚTR<sup>183</sup> (Figura 7).

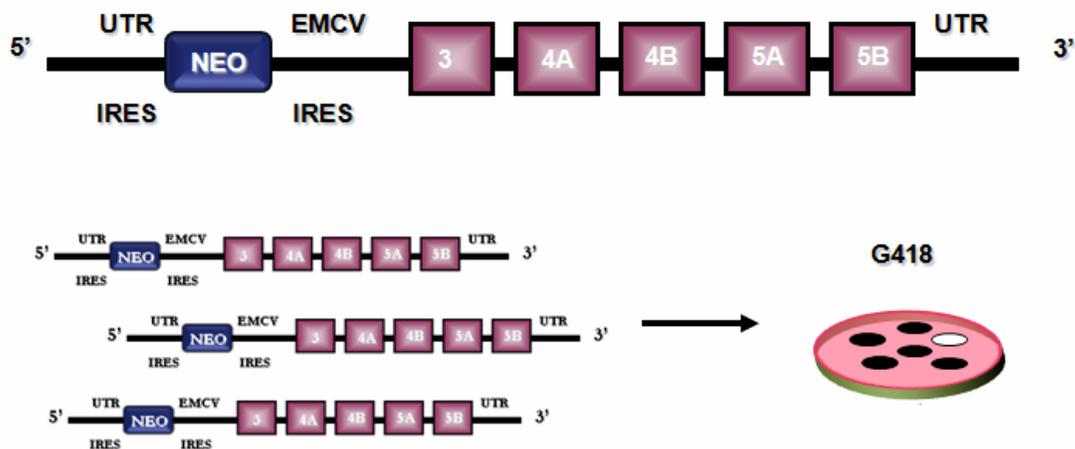


Figura 7. Esquema representativo de la estructura y establecimiento del replicón subgenómico de VHC. El modelo de replicón subgenómico alberga las secuencias que codifican para las proteínas no estructurales de VHC y el gen de neomicin fosfotransferasa cuya proteína inactiva el efecto citotóxico de G418<sup>181-183</sup>.

Ahora bien, una segunda secuencia IRES se insertó río abajo del gen NEO seguido de las secuencias codificantes NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Las células de

---

---

hepatocarcinoma Huh-7 infectadas con el replicón generan niveles de RNA en 5 órdenes de magnitud mayor a lo reportado en sistemas de cultivo celular infectado con partículas completas y maduras de VHC<sup>183,184</sup>.

Este modelo experimental es el más utilizado debido a que permite monitorear bajos niveles de replicación del virus y además no constituyen un peligro infeccioso ya que carece de las secuencias que codifican para las proteínas estructurales y por lo tanto no produce partículas virales maduras e infecciosas<sup>185,186</sup>.

## **2.10 ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO (AAS)**

El AAS, es un antiinflamatorio no esteroideo, con efecto inhibitorio en la síntesis de prostaglandinas ya que induce la inhibición de la enzima COX-2<sup>187</sup>.

Las ciclooxigenasas son las enzimas limitantes en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Existen dos isoformas (COX-1 y COX-2) ambas con un peso molecular de 71 kD y un 63% de homología entre ellas<sup>188</sup>, presentando sin embargo importantes diferencias en cuanto a inhibidores y localización intracelular. La COX-1 se expresa de forma constitutiva en muchos órganos y está relacionada con la síntesis de prostanoïdes en funciones celulares normales, mientras que la COX-2 generalmente es inducible por varios estímulos asociados con activación celular e inflamación (lipopolisacáridos, factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , interleucina-1, factores de crecimiento y esteres de forbol como el PMA)<sup>189</sup>.

COX-2 fue asociada previamente con la replicación de VHC y el desarrollo de carcinoma hepatocelular ya que en presencia de VHC se incrementa la expresión de COX-2<sup>190</sup>. Las proteínas no estructurales del virus activan a NF- $\kappa$ B vía estrés oxidativo, involucrando a COX-2 en el proceso ya que su promotor tiene una zona de reconocimiento para NF- $\kappa$ B. Los inhibidores de COX-2 incrementan la expresión de VHC, lo que sugiere que la enzima tiene un efecto negativo sobre el virus<sup>191</sup>.

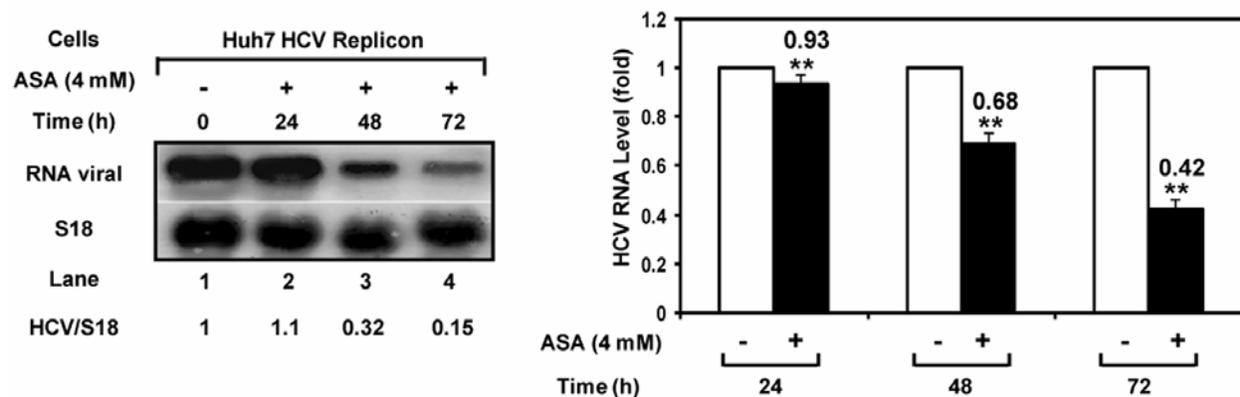
El AAS tiene propiedades, anti-trombóticas, anti-inflamatorias, anti-piréticas y anti-proliferativas<sup>187</sup>.

Los efectos de AAS sobre la agregación plaquetaria tienen lugar con dosis mucho menores que las requeridas para un efecto analgésico o anti-inflamatorio. La enzima COX-1 de las plaquetas es más sensible que la COX-1 del endotelio, lo que explica la necesidad de dosis muy bajas de aspirina para conseguir un efecto anti-trombótico, lo cual resulta ideal en pacientes con enfermedad coronaria. Se cree que los efectos benéficos de la aspirina en la prevención del infarto de miocardio se deben a su capacidad para reducir los niveles de proteína C reactiva<sup>192</sup>.

La actividad anti-inflamatoria del AAS se atribuye a la inhibición de la COX-2 ya que reduce la síntesis de las prostaglandinas E y F, las cuales, son responsables de la vasodilatación y la permeabilidad capilar lo que, a su vez, aumenta la movilidad de fluidos y leucocitos que ocasionan la inflamación, enrojecimiento y dolor<sup>193</sup>.

La capacidad anti-proliferativa de AAS pudiese ser atribuida a la producción de ácidos grasos como 15R-hydroxieicosatetraenoico (15R-HETE) asociados previamente con efectos antiproliferativos<sup>194</sup>.

**2.11 EFECTO ANTIVIRAL DE AAS SOBRE VHC.** En el año 2008 se publicó que el AAS, a una concentración de 4mM (no citotóxica), disminuye los niveles del RNA de VHC en células Huh-7 que expresan de forma estable las proteínas no estructurales del virus (Huh-7-VHC-replicón) (Figura 8)<sup>195</sup>. El mecanismo mediante el cual ocurre este fenómeno aun es desconocido, pero se sospecha la participación de elementos de respuesta a estrés oxidativo.



**Figura 8.** AAS disminuye los niveles del RNA de VHC (Hepatology. Vol. 47, No 5, 2008)

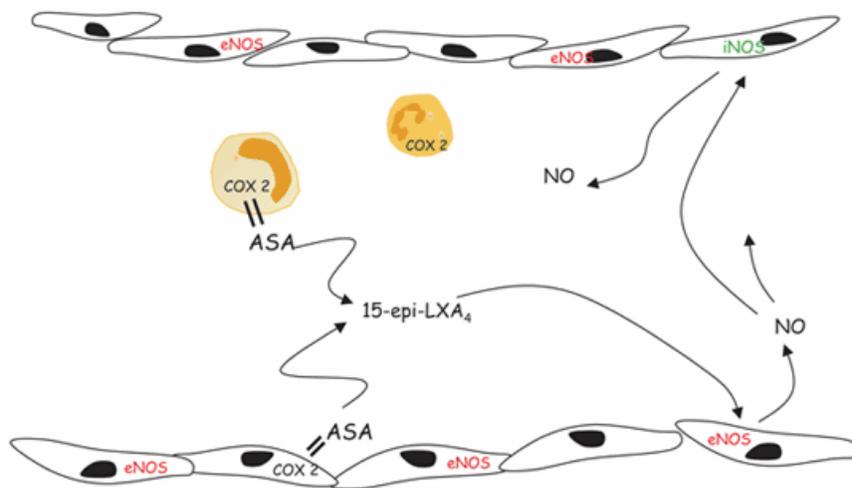
---

---

Por otra parte, se ha comprobado que en células endoteliales, el AAS, modula la producción de MAPK, miRNAs, óxido nítrico, entre otros <sup>196</sup>.

**2.12 AAS Y ÓXIDO NÍTRICO.** La aspirina *per se* es capaz de incrementar la producción de NO en diversos modelos celulares (Figura 9) <sup>197</sup>. A nivel químico, se han desarrollado moléculas de aspirina liberadoras de óxido nítrico para el aprovechamiento de las propiedades farmacológicas de ambos principios activos <sup>198</sup>. NCX-4016 (nitro-aspirina), es un compuesto dual que consiste en una molécula de aspirina unida covalentemente con  $\text{NO}_3^-$ . Su fórmula química es 2-(acetiloxi) ácido benzoico 3-[(nitrooxi)metil]fenil ester <sup>199</sup>.

Inicialmente, NCX-4016 surge como una alternativa para reducir los efectos gastrointestinales no deseados de la aspirina <sup>200</sup>. La actividad biológica de NCX-4016 ha sido evaluada en diferentes modelos experimentales, donde se han evidenciado sus actividades anti-inflamatorias, anti-trombóticas y analgésicas. NCX-4016 tiene efectos benéficos superiores a los de la aspirina en modelos experimentales de infarto de miocardio, ictus, lesión cardíaca por isquemia y reperfusión) <sup>201</sup>.



**Figura 9.** Cuando AAS acetila a COX-2 se generan epi-lipoxinas las cuales inducen la producción de óxido nítrico a través de eNOS en células endoteliales <sup>196</sup>.

---

---

## 2.13 OXIDO NITRICO (NO)

El NO, juega un papel importante en la defensa inmunológica actuando como un agente antimicrobiano<sup>202</sup>; sin embargo, existe evidencia paradójica, de su papel como efector antiviral<sup>203</sup>.

El NO tiene complejas funciones ya que actúa en la inhibición de la agregación plaquetaria, es un neurotransmisor en el sistema nervioso central y también interviene en reacciones de quimiotaxis y citotoxicidad. Por otra parte, elevadas concentraciones de NO están involucradas en ciertas situaciones fisiopatológicas como la hipotensión que acompaña al shock séptico y la respuesta inflamatoria inducida por daño tisular<sup>204,205</sup>.

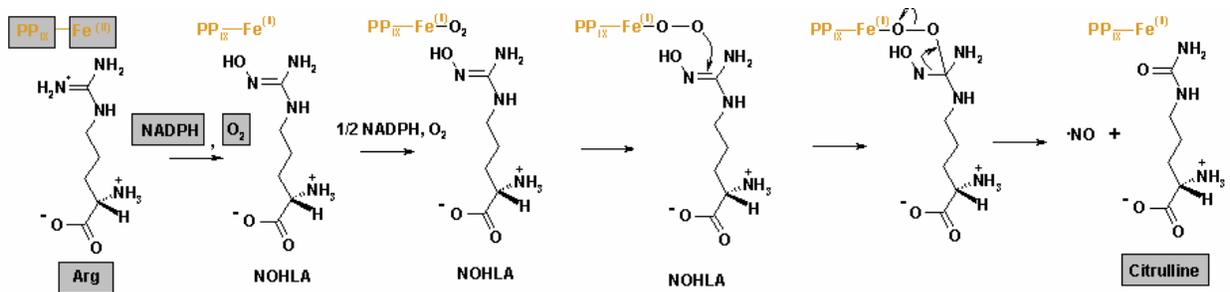
El óxido nítrico es un gas soluble y altamente lábil que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina. Para la síntesis de NO, además de la L-arginina como sustrato, se requiere de la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH). Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) y puede ser inhibida por derivados estructurales de dicho aminoácido: la N-mono-metil-L-arginina (LNMMMA), la N-nitro-L-arginina metiléster (LNAME) y otros<sup>206</sup>.

Cuando la CaM no se encuentra unida a la enzima, los electrones donados por el NADPH no fluyen desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa y son aceptados por el citocromo C y otros aceptores de electrones. En presencia de la calmodulina los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por FMN hacia el grupo hemo. La L-arginina se convierte en N-hidroxialanina y luego en NO y L-citrulina<sup>207</sup>.

En estas condiciones, la NOS produce una mezcla de aniones superóxido ( $O_2^-$ ) y óxido nítrico que reacciona con peroxinitritos ( $ONCO^-$ ) y como resultado final tiene lugar la citotoxicidad. En ausencia de TBH la NOS genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), superóxido y óxido nítrico<sup>208</sup>.

Los productos finales del NO *in vivo* son: nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). El mejor índice de óxido nítrico total es la suma de ambos productos, debido a que la proporción relativa de cada uno de ellos dentro de una misma muestra resulta variable<sup>209</sup>.

La relación de nitrito/nitrato puede ser medida a través de sistemas colorimétricos que tiene un valor normal de 1.0  $\mu\text{M}$  (Figura 10)<sup>210</sup>.



**Figura 10.** Síntesis de NO a través de la conversión de L-arginina en L-citrulina.

NO es un mensajero intracelular omnipresente, involucrado en la modulación del flujo sanguíneo, actividad neuronal y efecto antimicrobiano. Existen tres isoformas de NOSs: Calcio dependiente: NOS epitelial (eNOS) y NOS neuronal (nNOS) y Calcio independiente: NOS inducible (iNOS)<sup>211</sup>.

Las isoformas constitutivas eNOS o tipo III y la nNOS o tipo I están presentes en diferentes tejidos (células endoteliales, neuronas, neuroglías y otros) que producen concentraciones fisiológicas de NO al actuar como segundo mensajero<sup>215</sup>.

## 2.14 OXIDO NITRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS)

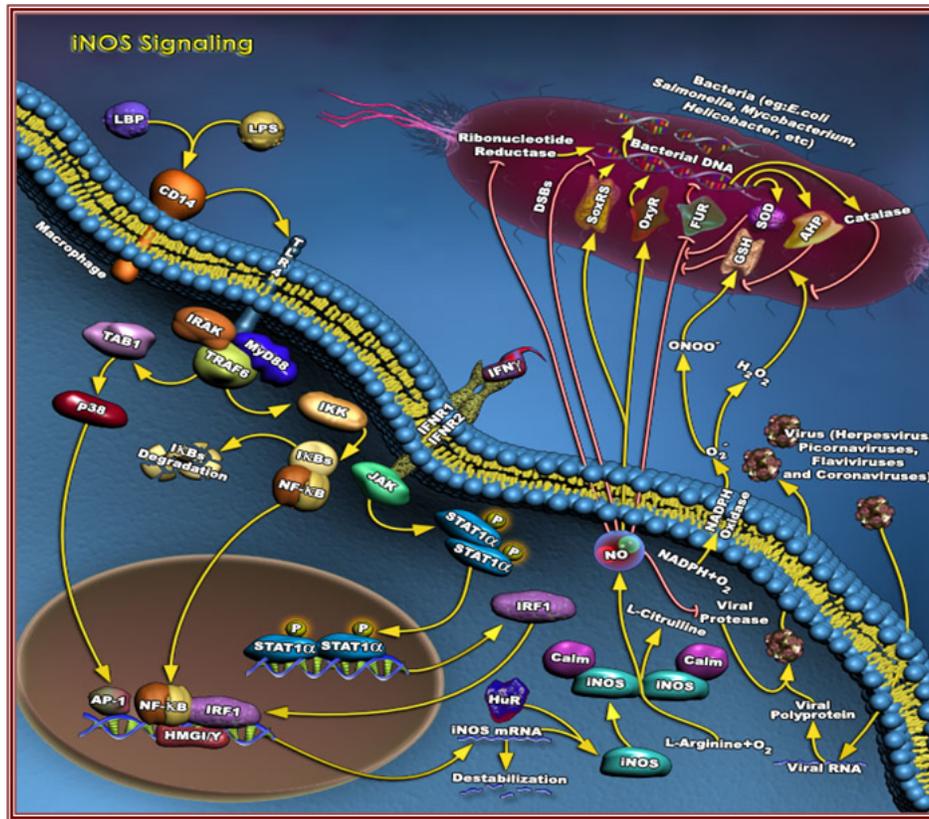
La expresión de iNOS es el resultado de diversas respuestas inflamatorias difusas o localizadas resultantes de la infección o daño tisular. La respuesta inflamatoria es parte de una respuesta adaptativa, la expresión de iNOS es beneficiosa; cuando la expresión

---

---

de iNOS es parte de una inflamación anormal, esta expresión puede ser perjudicial (ejemplo, enfermedades autoinmunes). Como aspectos beneficiosos puede destacarse que la expresión de iNOS resulta en la inhibición del crecimiento de patógenos desde microorganismos hasta virus<sup>212</sup>. Y también parece proteger a los tejidos del daño en respuestas agudas inflamatorias sistémicas como la sepsis<sup>213</sup>. La vasodilatación resultante de la expresión de iNOS mejora la perfusión durante la sepsis, pero si ésta es excesiva la hipotensión resultante puede llegar a ser refractaria y por lo tanto, letal. En el contexto de los órganos sólidos, la expresión de iNOS en endotoxemia podría ser citoprotectora, ya que previene la formación de microtrombos inhibiendo la agregación plaquetaria y la lesión mediada por radicales del oxígeno<sup>214</sup>.

iNOS, está implicada en el funcionamiento anti-microbiano de macrófagos, en enfermedades inflamatorias y auto-inmunes. iNOS, puede ser activada por lipopolisacáridos (LPS) y por varias citocinas, específicamente Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>216</sup> (Figura 11). El NO producido por iNOS juega un papel importante en la defensa inmunológica actuando como un agente antimicrobiano<sup>217</sup>.



**Figura 11.** Vía de señalización para la producción de NO. iNOS puede ser activada a través de LPS y citocinas. Los LPS están presentes en la pared de bacterias gram negativas y pueden activar a los receptores tipo Toll tipo 4 generando una cascada de señalización que activa NF-κB y con ello se expresan genes asociados a estrés oxidativo, entre ellos iNOS. Otra vía alterna, involucra a IFN-γ que induce la vía JAK-STAT y genes relacionados con respuesta a IFN. Cuando iNOS transforma L-arginina a L-citrulina, sintetiza NO el cual es liberado para modular la oxidación y nitración de proteínas en bacterias y virus generando daños irreversibles. La figura fue tomada de la página [www.ambion.com](http://www.ambion.com)

Mediante el análisis bioinformático de la secuencia del promotor de iNOS se han identificado sitios de unión para NF-κB, AP-1, NFIL-6, elementos de respuesta a interferón y TNF-α<sup>218</sup>.

Cuando NO y radicales superóxido son sintetizados en un diámetro pequeño reaccionan espontáneamente para formar peroxinitritos, los cuales reaccionan directamente con moléculas ricas en electrones<sup>219</sup>. Los peroxinitritos inducen estrés nitrosativo, lo que conlleva la generación de lípidos nitrados, nitrotioles, nitrotriptofanos y nitrotirosinas<sup>220</sup>.

---

---

Las infecciones están comunmente asociadas con un incremento significativo en la expresión de iNOS y por ende en la producción de NO en los sitios de infección como en los casos de tuberculosis<sup>221,222</sup>.

La expresión de iNOS se ha demostrado que está asociada a la resistencia a distintos microorganismos como las micobacterias, los hongos *Histoplasma capsulatum* y *Criptococcus neoformans* y protozoos como *Leishmania major*<sup>223</sup>.

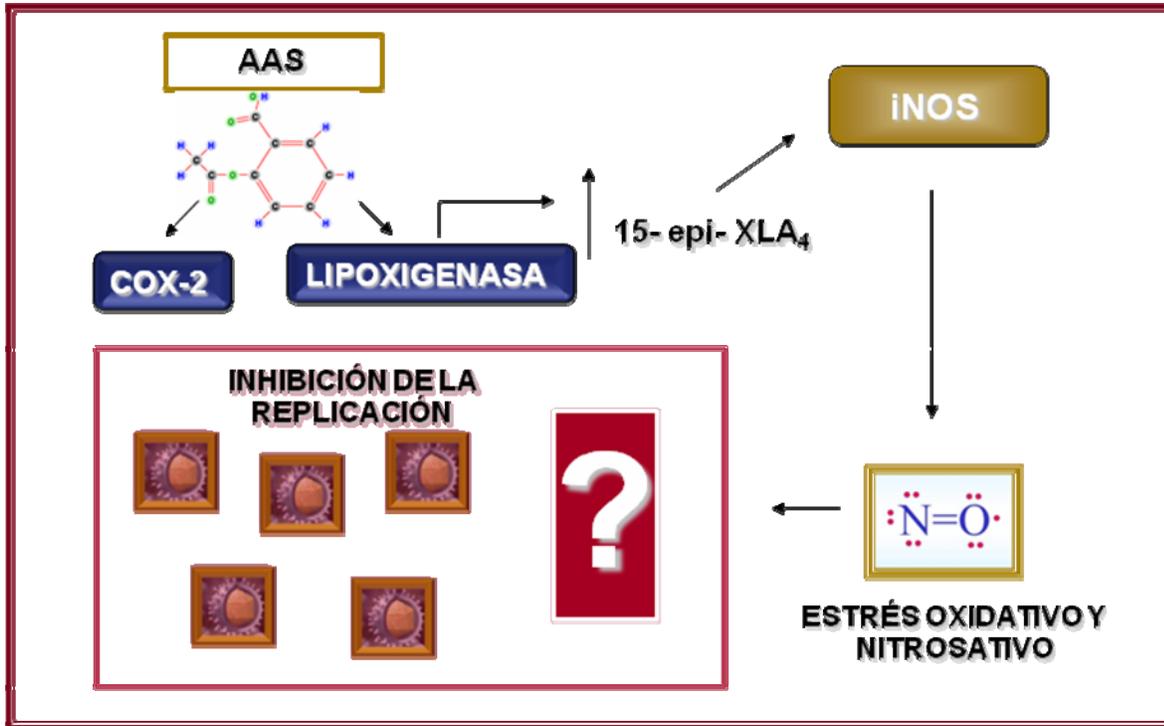
En infecciones virales, la expresión de iNOS parece ser regulada indirectamente por Interferón- $\gamma$  o bien, por una vía directa como ocurre en la infección causada por el VIH-1<sup>224,225</sup>.

La actividad de NO contra virus ha sido previamente evidenciada ya que en algunos ensayos *in vitro* se observa un descenso de la severidad patológica en ciertas infecciones virales incluyendo al VHS; sin embargo, la replicación de coxsackievirus, es suprimida por NO, a través de la inactivación de la cistein proteasa viral por S-nitrosilación y también se ha descrito un efecto adverso sobre el virus de la influenza en presencia de peroxinitritos<sup>226</sup>.

---

En resumen, el AAS reduce la expresión del VHC a nivel transcripcional y dicho efecto podría ser atribuido a un incremento en la concentración de NO, el cual provoca un descenso en la síntesis del RNA viral por un mecanismo aún desconocido que pudiese ser de tipo génico y/o inmunomodulador. Basados en nuestros resultados, planteamos la siguiente hipótesis: en células de hepatocarcinoma el AAS podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la replicación del VHC estimulando la producción de lipoxigenasas. Este efecto es capaz de inducir una elevación en la cantidad de epi-lipoxinas que estimularían la actividad de iNOS incrementando con ello la concentración de NO y por ende creando un contexto de estrés oxidativo y nitrosativo, que al menos en parte podría estar regulando el efecto negativo de AAS sobre el VHC (Figura 12).

---



**Figura 12.** Esquema del posible estrés nitrosativo inducido por AAS, en células de hepatocarcinoma infectadas por VHC.

---

---

## CAPITULO III

### 3. JUSTIFICACION

La infección por VHC tiene un impacto trascendental como problema de salud pública a nivel mundial, por lo tanto, el planteamiento de nuevas terapias antivirales es de extrema importancia.

El AAS disminuye la replicación del VHC; sin embargo, se desconoce el (los) mecanismo (s) a través de los cuales se lleva a cabo este efecto. AAS induce la producción de NO en células endoteliales y macrófagos. Se le han atribuido propiedades antivirales al NO basado en antecedentes experimentales donde se observa un efecto inhibitorio en la replicación de ciertos virus de DNA y RNA, en presencia de niveles de NO incrementados.

El entendimiento de la participación de los efectores moleculares en la modulación de la replicación del VHC inducida por AAS, promoverán la identificación de nuevos potenciales blancos terapéuticos que permitan optimizar seleccionar y/o rediseñar nuevos principios activos con mayor efecto farmacológico.

---

---

## CAPITULO IV

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la disminución de la expresión del VHC inducida por AAS involucra mecanismos de regulación molecular mediados por óxido nítrico.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

I. Medir la cinética de la concentración de NO en células Huh-7 Replicón tratadas con AAS y determinar el efecto de la inhibición ó incremento de la síntesis del NO sobre la replicación VHC.

II. Evaluar el papel de iNOS sobre la replicación de VHC mediante un sistema de iRNA.

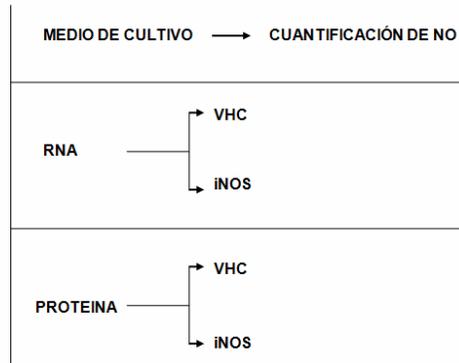
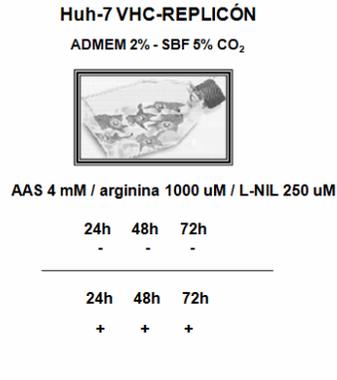
III. Analizar la participación de AAS sobre la actividad del promotor de iNOS.

IV. Obtener el perfil de expresión transcripcional de células Huh-7 tratadas con AAS en presencia del replicón subgenómico del virus de la hepatitis C.

## CAPITULO V

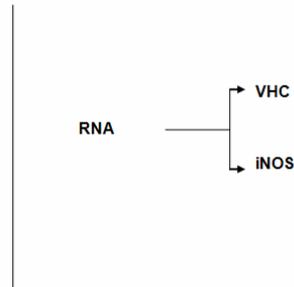
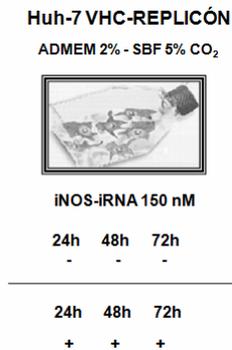
### 5. ESTRATEGIA GENERAL

#### OBJETIVO I



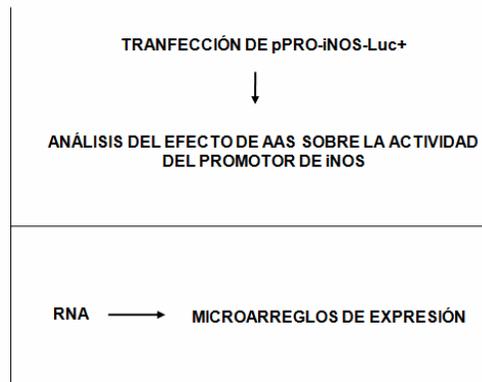
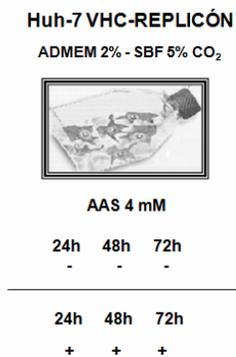
**ANALISIS DE RESULTADOS**

#### OBJETIVO II



**ANALISIS DE RESULTADOS**

#### OBJETIVOS III Y IV



**ANALISIS DE RESULTADOS**

---

---

## CAPITULO VI

### 6. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 6.1 CULTIVO CELULAR

Células de hepatocarcinoma Huh-7 que expresan constitutivamente el plásmido PFK<sub>381</sub>-1-NS3-3' (replicón subgenómico de VHC, genotipo 1b)<sup>181</sup> (Huh-7-VHC-replicón), fueron cultivadas en medio ADVANCED-DMEM suplementado con 2% de suero bovino fetal (SBF), 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina), 1% de glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 500ug/mL de geneticina para conservar la selección del plásmido.

#### 6.2 CUANTIFICACIÓN DE NO MEDIANTE HPLC CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA

Células Huh-7-VHC-replicón, fueron expuestas a 4 mM de AAS (concentración no citotóxica con efecto antiviral sobre VHC); se cuantificó en el medio de cultivo la producción de NO a través de la medición de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), utilizando un sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con un detector de fluorescencia:  $\lambda$  excitación 375 nm y  $\lambda$  emisión 415 nm.

Se sembraron 45,000 células Huh-7-VHC-replicón, en placas de 35 mm y posteriormente se trataron con AAS 4 mM. Se procesaron 500 uL de medio de cultivo de células Huh-7-VHC-replicón expuestas 24, 48 y 72 h a AAS y 500 uL de medio de cultivo de células Huh-7-VHC-replicón exentas del tratamiento (0, 24, 48 y 72 h). Las muestras fueron precipitadas con acetonitrilo en una proporción 1:2 (soluto:reactante), para remover las proteínas; el sobrenadante se recolectó y evaporó; posteriormente se reconstituyó el sedimento en H<sub>2</sub>O mili Q estéril y se hizo reaccionar con 2'-3' diaminonaftaleno (DAN) para su conversión a 2'-3' naftotriazol (NAT), en presencia de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, como indicador indirecto de NO.

---

---

Para definir la concentración de NO se preparó una curva estándar de referencia de  $\text{NO}_2^-$  (125-1000  $\mu\text{M}$ ), y se validó mediante regresión lineal y coeficiente de variación para definir precisión.

### **6.3 RT-PCR PARA LA SEMI-CUANTIFICACIÓN DE INOS.**

Se sembraron 180,000 células Huh-7-VHC-replicón en placas de 35 mm y se expusieron a 4mM de AAS, 1000 $\mu\text{M}$  de arginina ó 100 $\mu\text{M}$  de L-NIL durante, 24, 48 y 72 h para extraer el RNA total. Se realizó una retrotranscripción utilizando la enzima MMLV (marca invitrogen) y del DNA complementario (cDNA) se amplificó un fragmento de 290 pb con un juego de primers específicos (Primer Forward: 5'-CCC TTT ACT TGA CCT CCT AAC-3'. Primer Reverse: 5'-AAG GAA TCA TAC AGG GAA GAC-3'), para evaluar el efecto de AAS en la expresión de iNOS (Óxido Nítrico Sintasa Inducible). Se seleccionó 58° C como temperatura de alineamiento. Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio; de forma paralela se realizó RT-PCR para una secuencia específica de Actina, con la finalidad de normalizar los resultados obtenidos para iNOS mediante densitometría.

### **6.4 PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL RNA DE VHC E INOS.**

Los extractos de RNA derivados de células expuestas a 1000  $\mu\text{M}$  de arginina ó 100  $\mu\text{M}$  de L-NIL durante, 24, 48 y 72 h sirvieron como molde para producir cDNA mediante RT-PCR y así cuantificar los niveles de VHC utilizando el siguiente juego de primers: Primer forward (75-93 nt), 5'-GCG TCT AGC CAT GGC GTT A-3'. Primer reverse (138-157 nt), 5'-GGT TCC GCA GAC CAC TAT GG-3'. Sonda TaqMan (94-110 nt): 5'-FAM-CTG CAC GAC ACT CAT AC-NFQ-3'. Para la cuantificación de iNOS se usó Sybr Green: Primer forward 5'-GTT CTC AAG GCA CAG GTC TC-3', ay Primer reverse 5'-GCA GGT CAC TTA TGT CAC TTA TC-3'. Se amplificó a 50° C por 2 min y a 95°C

---

---

durante 10 min. Se seleccionaron 40 ciclos a 95° C por 15 seg y 60° C durante 60 seg. La expresión de GAPDH fue usada para normalizar la concentración de RNA de VHC.

## **6.5 WESTERN-BLOT PARA NS5A, iNOS Y PROTEINAS CON RESIDUOS DE TIROSINA NITRADOS.**

Se sembraron 850,000 células Huh-7-VHC-replicón en placas de 100 mm y se expusieron a 4 mM de AAS (24, 48 y 72 h) y al término de cada tiempo se extrajeron las proteínas totales utilizando un buffer de lisis con inhibidor de proteasas. Las proteínas fueron separadas mediante geles de acrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio y después se transfirieron a una membrana de polivilideno. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-nitrotirosina (diluido 1:200), NS5B (1:500) o iNOS (1:200). A las 12 h se retiró el anticuerpo primario, se lavó la membrana con un buffer de PBS y posteriormente se incubó la membrana con un anticuerpo secundario representado por inmunoglobulina G de ratón o conejo conjugado con peroxidasa (diluido 1:1000). La señal fué analizada mediante quimioluminiscencia.

## **6.6 CLONACIÓN DEL PROMOTOR DE iNOS EN pGL3-Luc+.**

Se amplificó una secuencia de ~2Kb correspondiente al promotor de iNOS con el siguiente juego de primers: forward 5' TAA GGT ACC AAT GCC ACA CCA AGC AGA CGC- 3' y reverse 5' AAT CCC GGG GAA CAC ACT GGC AGC CAA GAA 3'. La secuencia del promotor de iNOS y el vector pGL3 fueron digeridos con las enzimas de restricción KpnI y SmaI y posteriormente ambos productos fueron purificados y ligados. El plásmido resultante fue propagado en bacterias E. coli TOP 10. El promotor se caracterizó con las enzimas de restricción BclI y SspI.

---

---

## **6.7 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS TOP 10 CON EL PLÁSMIDO pPRO-iNOS-Luc+.**

Se añadieron 100 µL de bacterias *E. coli* calcio competentes (*TOP10*) a 1 µL de plásmido pPRO-iNOS y se incubó en hielo durante 30 min. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 90 seg sin agitar (thermomixer), posteriormente se incubó 10 min en hielo. Se agregaron 100 µL de medio LB y se incubó 1 h a 37°C (thermomixer ó incubadora). Se realizó una centrifugación durante 7 seg. Se retiraron 120 µL de sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en el medio residual, para después sembrar la suspensión en cajas petri con medio LB-agar y ampicilina 1X. Se incubó a 37°C 12 h.

## **6.8 SELECCIÓN DE LAS COLONIAS Y EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.**

Se aislaron las colonias blanco mediante picadura para después inocular 15 mL de medio LB. Se incubó 12-18 h a 37° C con agitación y se centrifugó a 5000 rpm durante 3 min. Después de eliminar el sobrenadante se resuspendió la pastilla con 150 uL de Solución I. La suspensión se recuperó y colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se añadieron 300 uL de solución II. Se mezcló por inversión. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 225 uL de solución III. Se mezcló por inversión. Se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min y se recuperó el sobrenadante.

Se añadieron 800 uL de isopropanol (0.6 volúmenes). Se mezcló por inversión e incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 6 min. Se retiró el sobrenadante. Se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%. Se centrifugó 1 min a 14,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. El DNA se resuspendió en 100 uL de H<sub>2</sub>O miliQ.

## **6.9 CO-TRANSFECCIÓN DE pPROiNOS-Luc+ Y pCMV-RENILLA**

En una placa de 96 pozos, se cultivaron 15,000 células Huh-7-VHC-replicón por pozo. Se prepararon dos soluciones, la primera contenía 200 ng de plásmido pPROiNOS-Luc+, 100 ng de plásmido pCMV-RENILLA y medio sin suero ni antibiótico. La segunda solución contenía 0.3 uL de lipofectamina y medio sin suero ni antibiótico.

---

---

Se mezclaron muy cuidadosamente ambas soluciones. Se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Se colocaron 50 uL de la mezcla en cada pozo. Se incubaron las células 6 h a 37°C y finalmente se añadieron 200 uL de medio con suero y antibiótico. Los ensayos de luciferasa se realizaron 24 y 48 horas después de la transfección.

### **6.10 ENSAYO DE LUCIFERASA PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE iNOS.**

Las células co-transfectadas con el plásmido pPRO-iNOS-Luc+ y pCMV-RENILLA fueron lisadas a las 24 y 48 h. Para la detección de la señal se utilizó el sustrato de luciferasa y la solución STOP para renilla con la cual se normalizaron los valores de luciferasa. Se trataron las células con un buffer de lisis 1X. Se preparó sustrato de luciferasa para cada muestra. Se utilizaron 50 uL del sustrato de luciferasa para 10 uL del producto de la lisis. Se tomó la lectura de luciferasa en un luminómetro y posteriormente se añadieron 50 uL de solución STOP & Glo para realizar la lectura de renilla.

### **6.11 MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN**

Células Huh-7-VHC-replicón fueron sembradas en placas de 100x20 mm y expuestas a cuatro diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h) a AAS 4mM.

El RNA total se extrajo con columnas de la marca Qiagen. Las 21 muestras procesadas se mezclaron de forma independiente con un control de RNA con secuencias de poli-A y la mezcla se sometió a una retrotranscripción con un primer que contiene la secuencia del promotor de T7 unida a un oligonucleótido T.

El producto fue utilizado para realizar una amplificación para obtener moléculas de DNA de doble cadena que sirvieron como molde para la transcripción *in vitro* de fragmentos

---

---

de RNA ricos en uracilo en el extremo 5'. Los transcritos fueron marcados con biotina, purificados, fragmentados y finalmente hibridados en el chip.

## **6.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los experimentos se realizaron por triplicado y las variables fueron evaluadas mediante ANOVA de una vía y la prueba de Dunnet. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de  $p \leq 0.05$ .

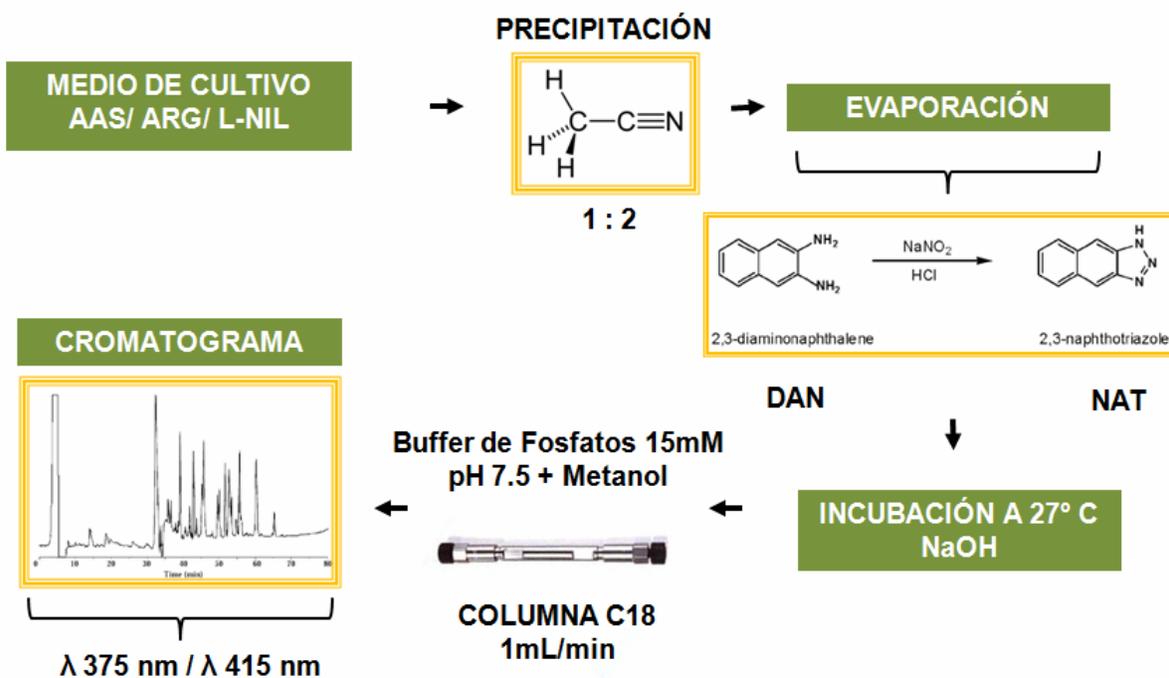
La curva de calibración obtenida para cuantificar nitritos fue evaluada mediante regresión lineal ( $y = mx + b$ ) y coeficiente de correlación  $r^2$ .

## CAPITULO VII

### 7. RESULTADOS

**7.1 AAS INCREMENTA LOS NIVELES DE NO EN CÉLULAS Huh-7-VHC-REPLICON.** Para esclarecer si AAS induce la producción de NO en células de hígado tumorales, se cuantificó la concentración de  $\text{NO}_2^-$  puesto que sirve como un método indirecto de detección de NO ya que los  $\text{NO}_2^-$  se generan como producto inmediato en la reacción que sufre NO en presencia de  $\text{O}_2$  para generar peroxinitritos.

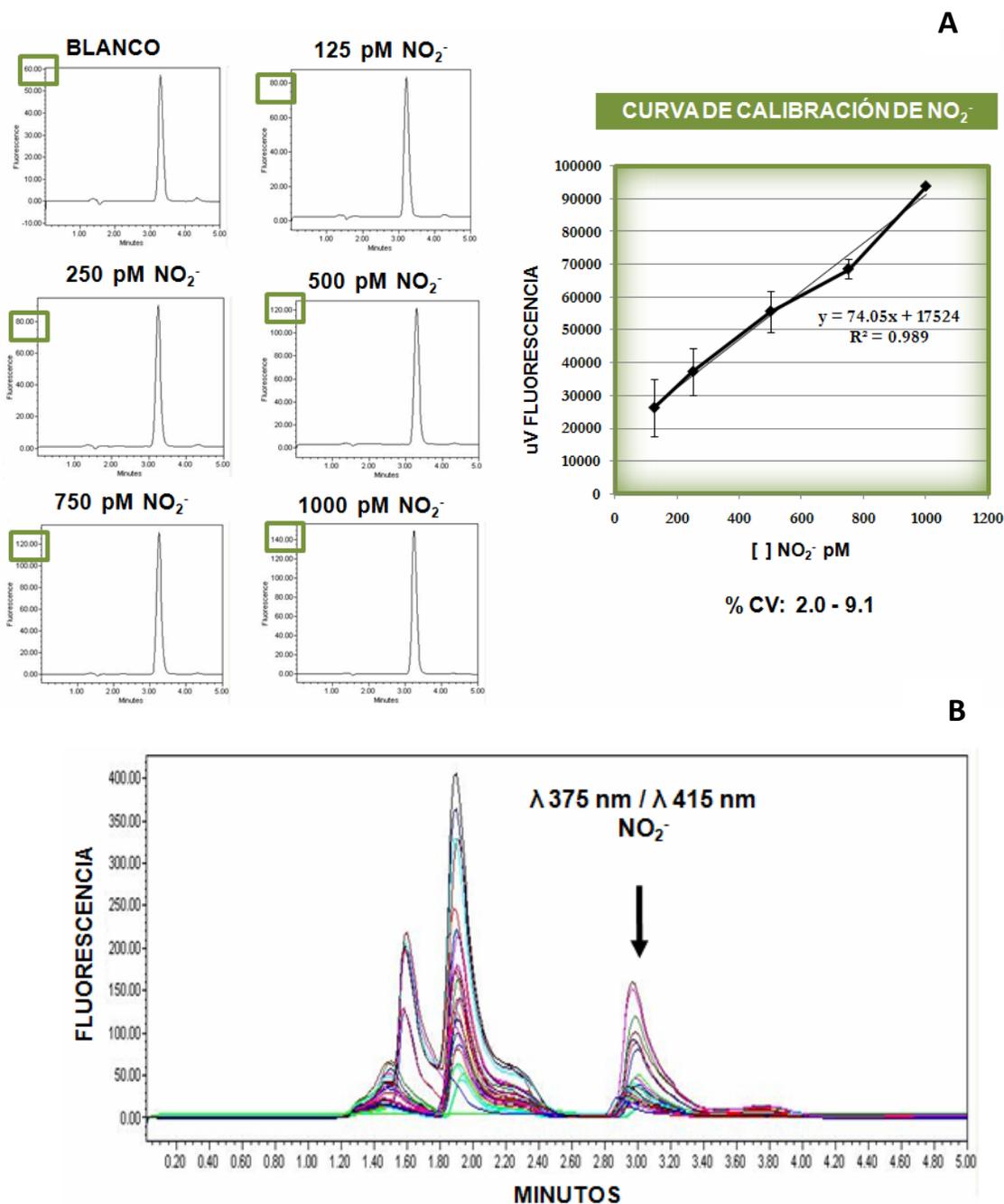
### CUANTIFICACIÓN DE NO MEDIANTE HPLC-FLU



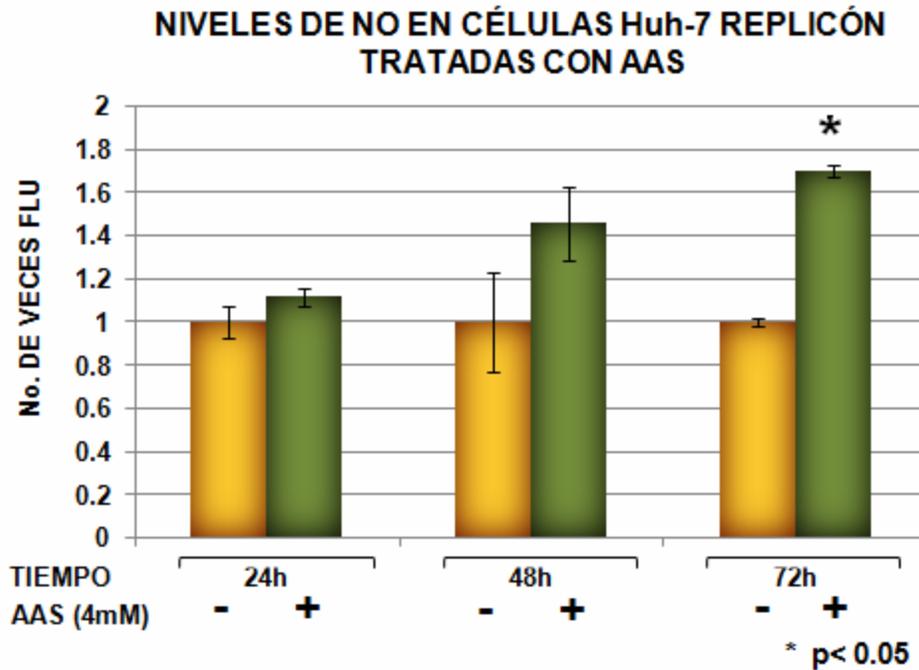
**Figura 13.** Estrategia general para la cuantificación indirecta de NO mediante HPLC.

Se preparó una curva estándar de referencia de  $\text{NO}_2^-$  (125-1000pM), y se validó mediante regresión lineal ( $r^2= 0.9206$ ;  $y= 0.9418x + 2.4122$ ). El medio de cultivo derivado de células Huh-7-VHC-replicón expuestas a 4mM de AAS fue procesado con acetonitrilo para remover las proteínas y conservar solo los depósitos de sal.

Cada muestra fué incubada con el agente derivatizante DAN, con lo que se obtuvo una señal fluorescente, detectada mediante HPLC y con un detector de fluorescencia (Figura 13). Las lecturas resultantes fueron interpoladas en la curva de calibración (Figura 14 A-B).



**Figura 14. A.** Cromatogramas utilizados para la construcción de la curva de calibración. **B.** Señal resultante para las muestras con un tiempo de retención de aproximadamente 3.2 min para  $\text{NO}_2^-$ .



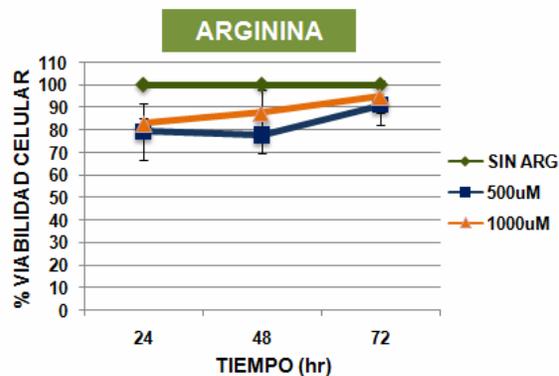
**Figura 15. Papel de AAS en la síntesis de NO en Huh-7-replicón.** La producción de NO fue 2.7 veces más alta en células Huh-7-replicón a las 72h post-tratamiento (AAS), versus al control negativo ( $p < 0.05$ ).

Se observó un incremento de los niveles de NO de 1.7 veces entre las células expuestas a AAS con respecto al control negativo desde las 24h, siendo significativo a las 72h ( $p < 0.05$ ) (Figura 10); los valores de fluorescencia se normalizaron con la cantidad de RNA correspondiente a iNOS. Estos resultados demuestran que AAS es capaz de estimular la síntesis de NO en células de hepatocarcinoma. Cabe señalar que este efecto coteja con el tiempo de inhibición de AAS sobre VHC (Figura 15).

Como controles en la producción de NO seleccionamos ARG (inductor de NO) y L-NIL (inhibidor de NO). Para identificar concentraciones no citotóxicas en células Huh-7 se realizó un ensayo de viabilidad celular (Figura 16). Seleccionamos 1000uM para arginina y 250uM para L-NIL y confirmamos que en nuestro modelo celular el efecto de arginina y L-NIL es inductor e inhibidor sobre NO, respectivamente (Figura 17).

## ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

TIEMPO	SIN ARG	MEDIA 500uM	MEDIA 1000uM	DE 500uM	DE 1000uM
24 h	100	79.3	83	12.8	2
48 h	100	77.6	87.6	7.7	10
72 h	100	91	95	8.7	7.2



TIEMPO	SIN L-NIL	MEDIA 100uM	MEDIA 500uM	DE 100uM	DE 500uM
24 h	100	90.33	85	3.21	5.29
48 h	100	84	82.33	4.35	3.05
72 h	100	93.3	97	7.23	6.08

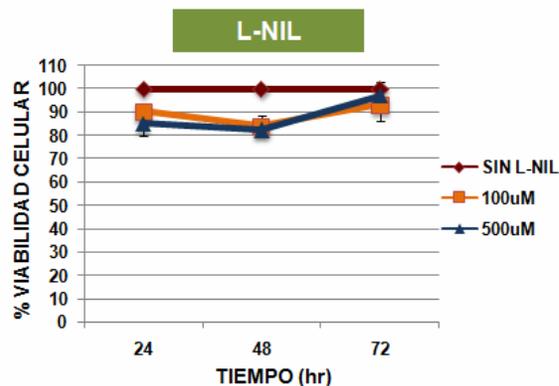


Figura 16. Ensayo de viabilidad celular para arginina y L-NIL.

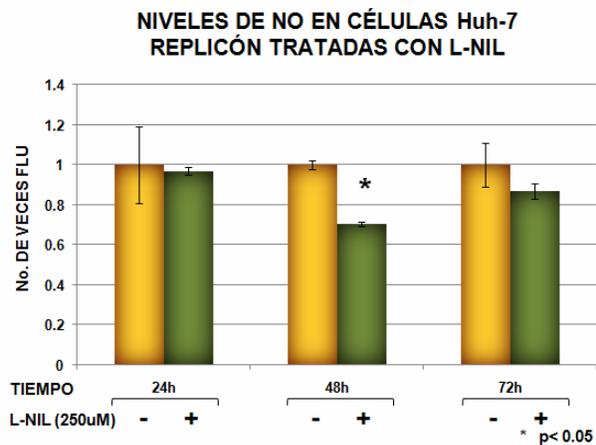
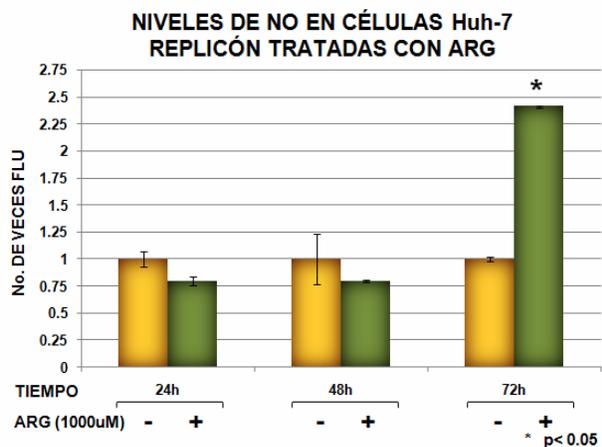
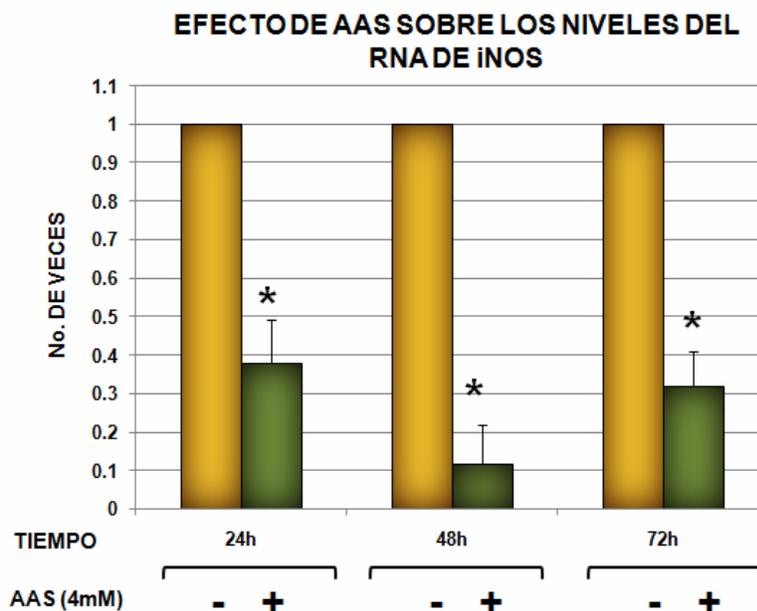


Figura 17. Efecto de arginina y L-NIL sobre los niveles de NO en células de hepatocarcinoma.

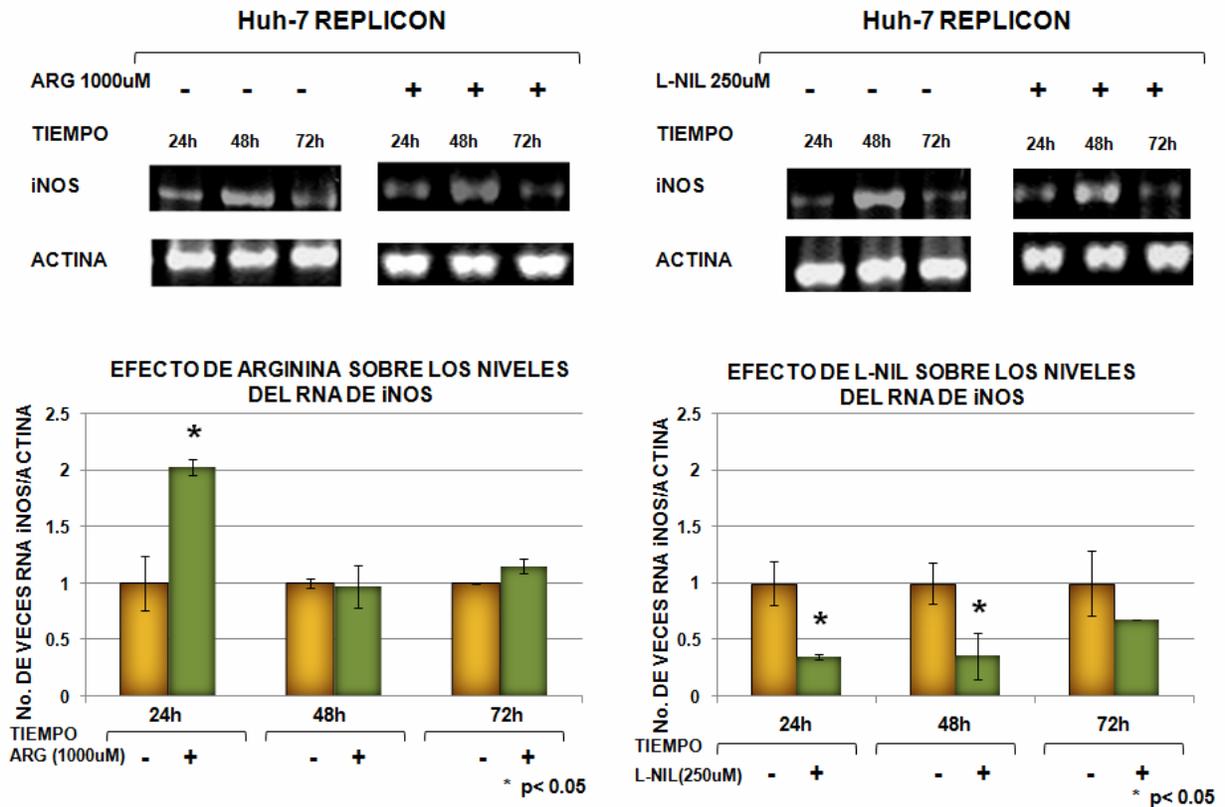
**7.2 AAS REDUCE LA EXPRESIÓN DE iNOS A NIVEL TRANSCRIPCIONAL.** Se extrajo el RNA total de células Huh-7-VHC-replicón, expuestas a 4 mM de AAS, 1000 uM de arginina (donador de NO) o 100 uM de L-NIL (inhibidor de iNOS). Se llevó a cabo una retrotranscripción para generar cDNA y posteriormente se realizó una PCR en tiempo real (sybr green) para el RNA derivado de células expuestas a AAS y PCR semi-cuantitativa utilizando un juego de primers específicos para iNOS para el RNA aislado de los cultivos expuestos a arginina y L-NIL.

Se normalizó cada valor correspondiente a iNOS con los valores de los productos de PCR de actina (gen constitutivo).



**Figura 18.** AAS reduce la expresión de iNOS a nivel transcripcional

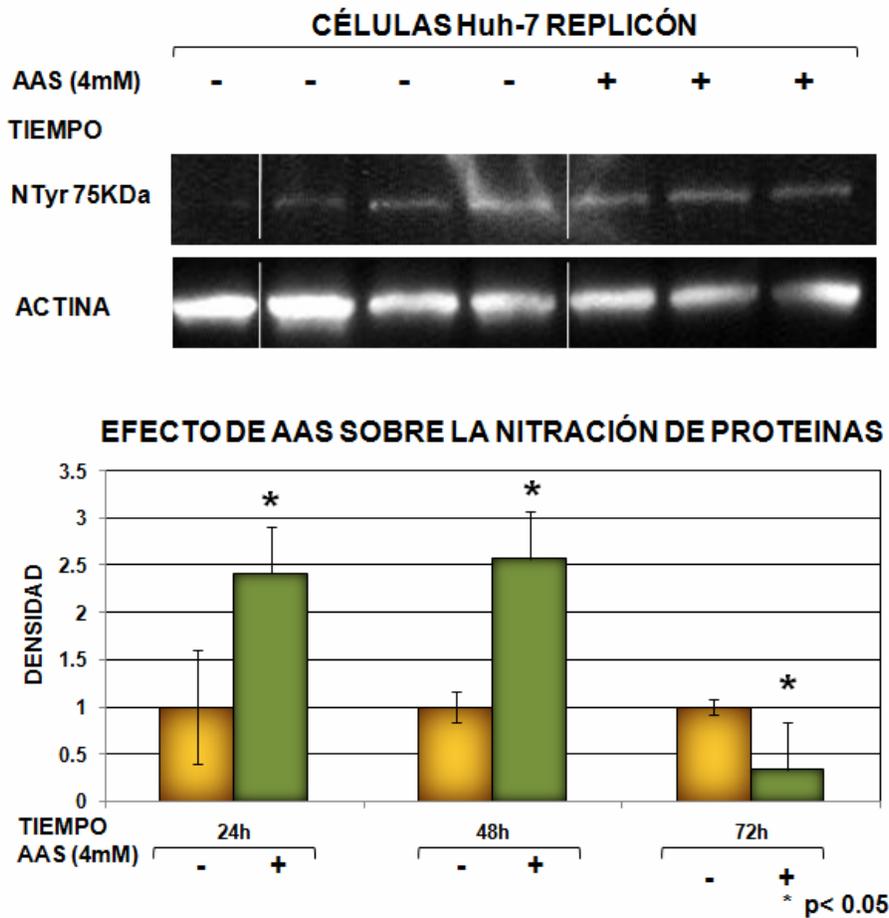
La expresión del RNA de iNOS en células Huh-7-VHC-replicón, disminuyó significativamente a las 24, 48 y 72 h ( $p < 0.05$ ) post-tratamiento (AAS), a diferencia de las células sin el principio activo (Figura 18). A las 24h, arginina duplicó los niveles de RNA de VHC, respecto al control negativo ( $p < 0.05$ ), mientras que L-NIL disminuyó la síntesis del RNA del replicón en un 70% ( $p \leq 0.05$ ). Por lo tanto, AAS ejerce un efecto semejante al de arginina al inducir la sobre-expresión de la enzima iNOS (Figura 19).



**Figura 19. Efecto de AAS, Arginina y L-NIL en la expresión del RNA de iNOS en Huh-7-replicón.** Los niveles de RNA de iNOS incrementan en presencia de AAS y Arginina a las 24h post-tratamiento en células Huh-7-replicón mientras que L-NIL induce un descenso en la expresión de iNOS.

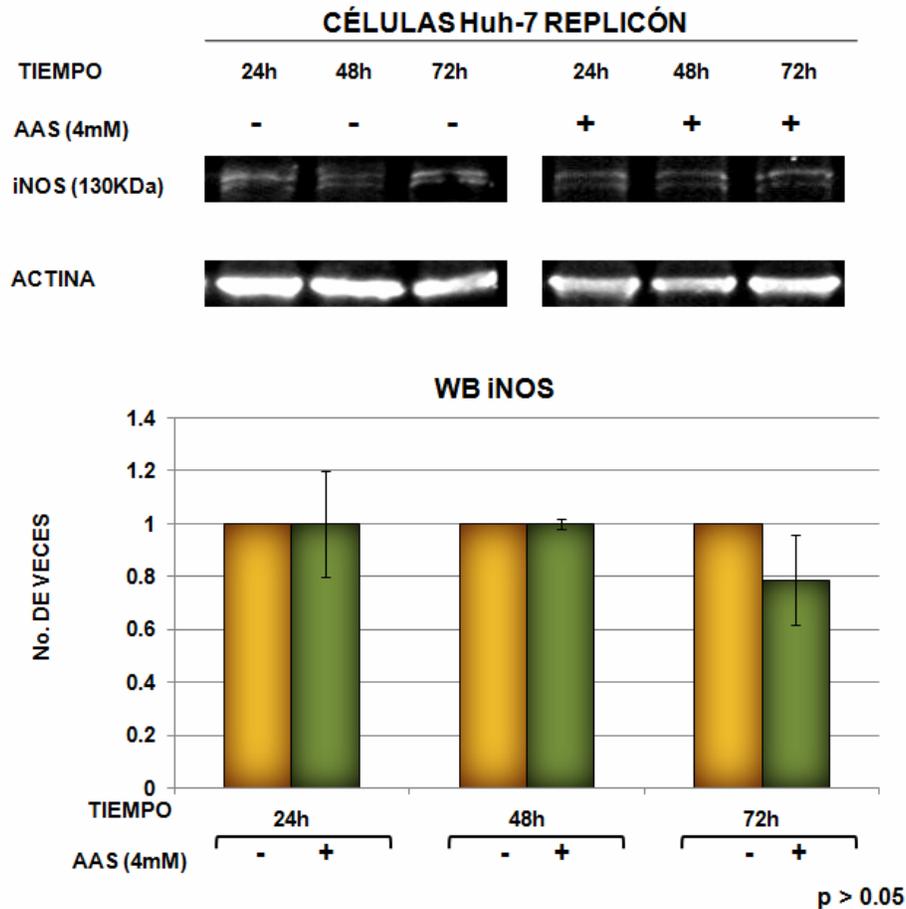
**7.3 AAS ESTIMULA LA NITRACIÓN DE PROTEINAS CON RESIDUOS DE TIROSINA.** Para evaluar si AAS es capaz de crear estrés nitrosativo en células hepáticas, se preparó un ensayo de Western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce residuos de nitrotirosina, los cuales sirven como marcadores de estrés generado por especies reactivas de nitrógeno. Se observó un aumento del 2.57 veces ( $p < 0.05$ ), en la cantidad de residuos de tirosina nitrados, en una proteína de ~ 75 KDa, en células Huh-7-VHC-replicón, a las 48h post-tratamiento (AAS), versus al control negativo (Figura 20). Estos resultados sugieren que AAS puede promover un incremento en la cantidad de especies reactivas de nitrógeno. Sin embargo, a las 72 h el efecto se ve revertido, esto podría ser atribuido a la activación de vía de

proteosoma mediado por ubiquitina ya que las proteínas oxidas y nitradas son altamente tóxicas y deben ser eliminadas.



**Figura 20. AAS y estrés nitrosativo.** Se detectó una diferencia estadísticamente significativa en células Huh-7-replicón, a las 48h post-tratamiento (AAS), con respecto al control negativo, representado por un incremento 2.57 veces ( $p < 0.05$ ), en la cantidad de residuos de tirosina nitrados, en una proteína de ~ 75 KDa en células expuestas a AAS.

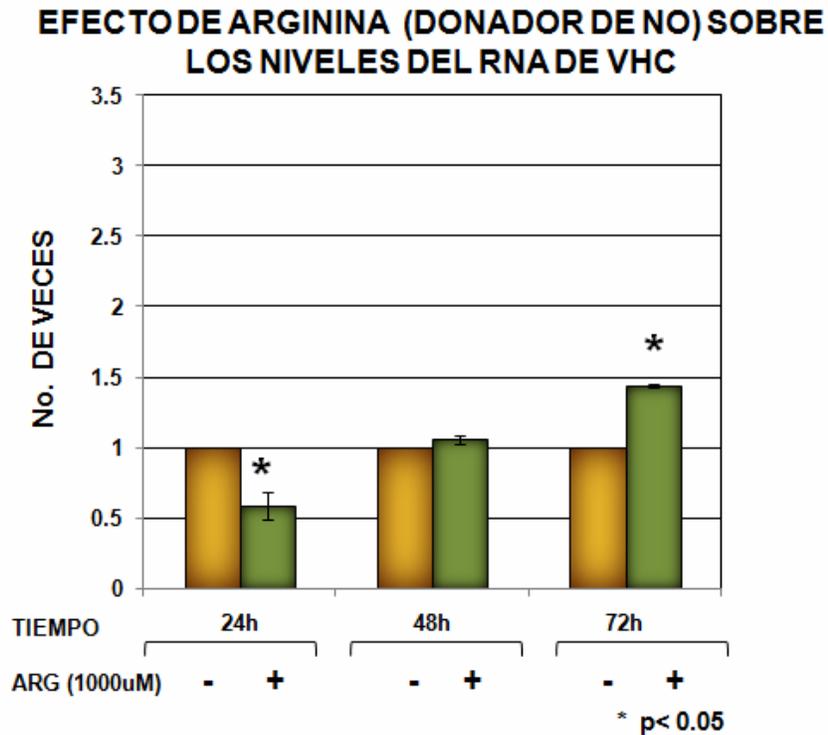
Al realizar la detección de iNOS mediante western blot en proteínas aisladas de células expuestas a AAS, encontramos una tendencia a disminuir la cantidad de la proteína a las 72h (Figura 21).



**Figura 21.** AAS induce una reducción en los niveles de iNOS a nivel proteico a las 72h post-tratamiento.

**7.4 EFECTO DEL NO SOBRE LOS NIVLES DEL RNA DE VHC.** Se trataron células Huh-7-VHC-replicón con 1000  $\mu$ M de arginina (donador de NO) o 100  $\mu$ M de L-NIL (inactivador de iNOS) y en ambas condiciones se extrajo el RNA total y se sometió a retrotranscripción para la síntesis de cDNA para la posterior cuantificación de los niveles de RNA de VHC mediante PCR en tiempo real con sondas fluorescentes.

Nuestros resultados cuantitativos reflejan una reducción de los niveles del RNA de VHC de 41% ( $p < 0.05$ ) durante el tratamiento con arginina a las 24h (Figura 22) y un aumento de 1.44 veces ( $p = 0.05$ ) (Figura 23), en presencia de L-NIL a las 72h post-tratamiento.



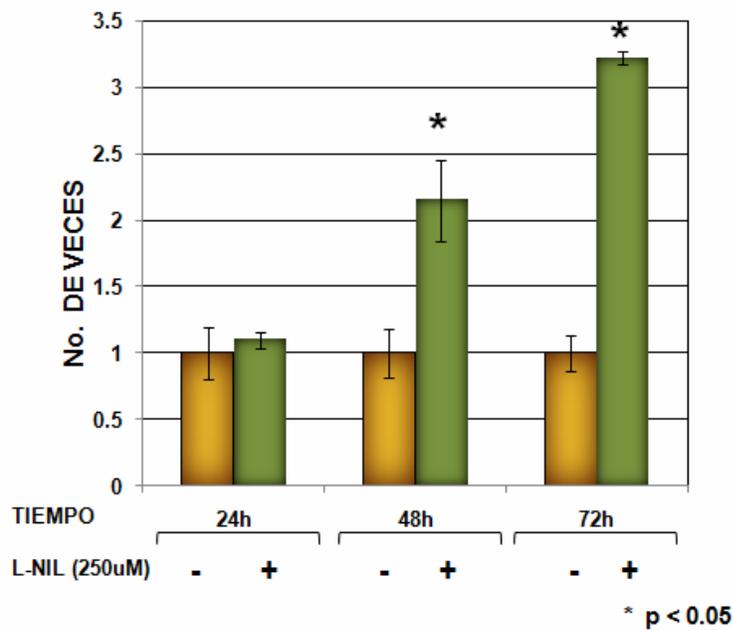
**Figura 22. Arginina disminuye la replicación de VHC en una etapa temprana.** Durante una corta exposición a Arginina (24h), los niveles del RNA de VHC descienden significativamente. Sin embargo, a las 72h post-tratamiento el efecto es revertido generando la sobreexpresión de VHC.

Cabe destacar, que los niveles de RNA de VHC, incrementan más del 40% con respecto a su control negativo a las 72h posteriores al tratamiento con arginina (Figura 22). Este efecto podría ser producto de una vía de rescate activada por el complejo de replicación viral para su supervivencia.

---

---

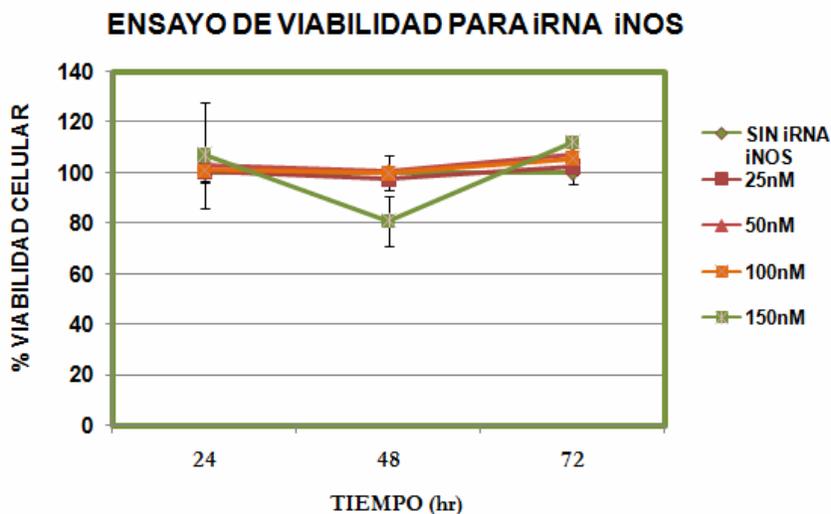
### EFFECTO DE L-NIL (INACTIVADOR DE iNOS) SOBRE LOS NIVELES DEL RNA DE VHC



**Figura 23. L-NIL aumenta la expresion del RNA de VHC.** La inactivación de iNOS en presencia de L-NIL conduce a un incremento estadísticamente significativo de los niveles de RNA viral, a las 72h post-tratamiento.

#### 7.5 EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE iNOS SOBRE LA EXPRESION DE VHC.

Para analizar el papel de iNOS sobre la expresion de VHC se transfectaron células Huh-7-VHC-replicón con un iRNA dirigido contra iNOS. Se realizó un análisis de viabilidad celular con 4 concentraciones diferentes de iRNA, desde 25 hasta 150 nM (Figura 24). Al final se seleccionó la concentración mas alta porque con 150 nM se obtiene el mayor efecto inhibitorio en los niveles de iNOS.



Tiempo	SIN iRNA iNOS	MEDIA 25nM	MEDIA 50nM	MEDIA 100nM	MEDIA 150nM	DE 25nM	DE 50nM	DE 100nM	DE 150nM
24 h	100	95.6	95.3	96.3	107	7.7	12.5	7	21
48 h	100	94	96	96.3	81	7.2	7	5.5	10
72 h	100	99.3	102.3	99.6	112	5.5	8.1	9.4	0

Figura 24. Ensayo de viabilidad celular para iRNA-iNOS.

Previo a la transfección con iRNA-iNOS se realizaron ensayos con controles de transfección utilizando iRNA-GAPDH e iRNA non sense. Al analizar los resultados confirmamos que el iRNA-GAPDH reduce los niveles de RNA de su blanco mientras que el iRNA non sense no modifica los niveles de expresión de GAPDH (Figura 25).

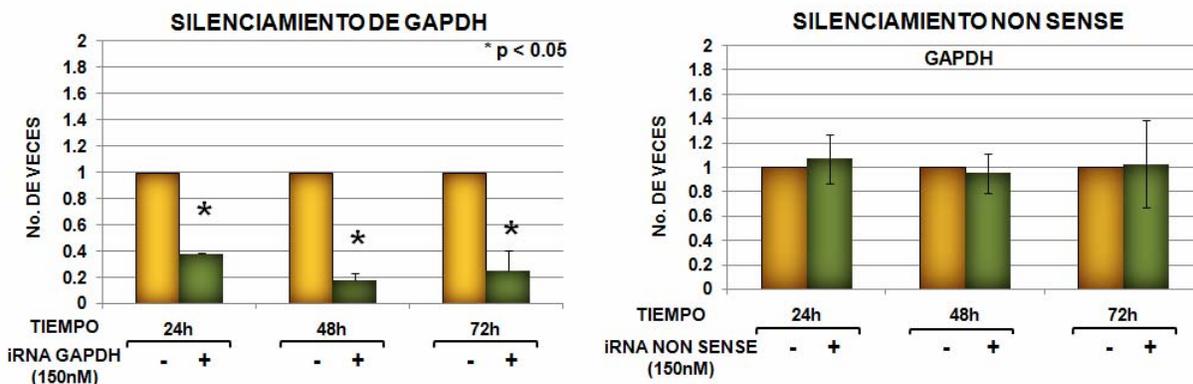
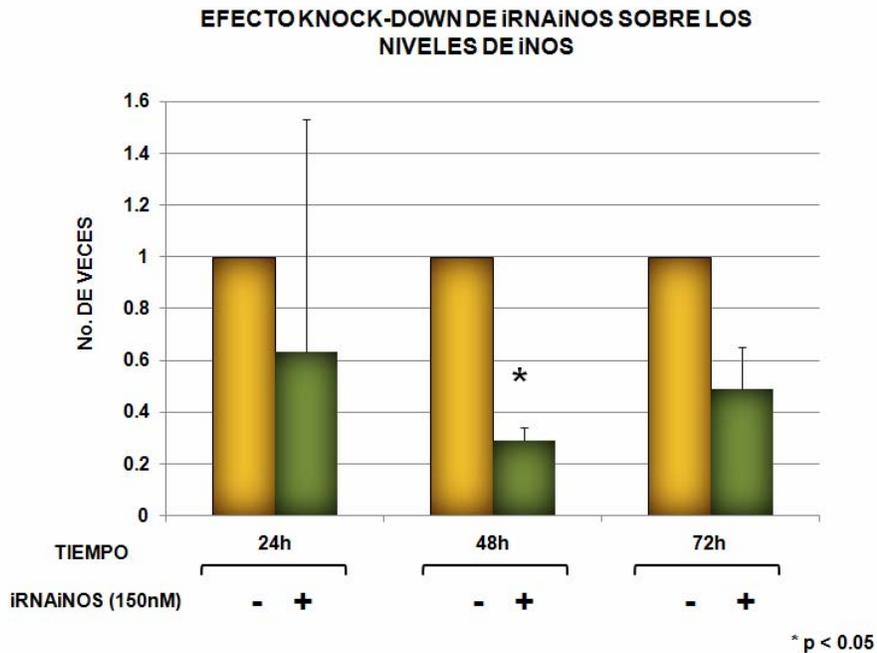
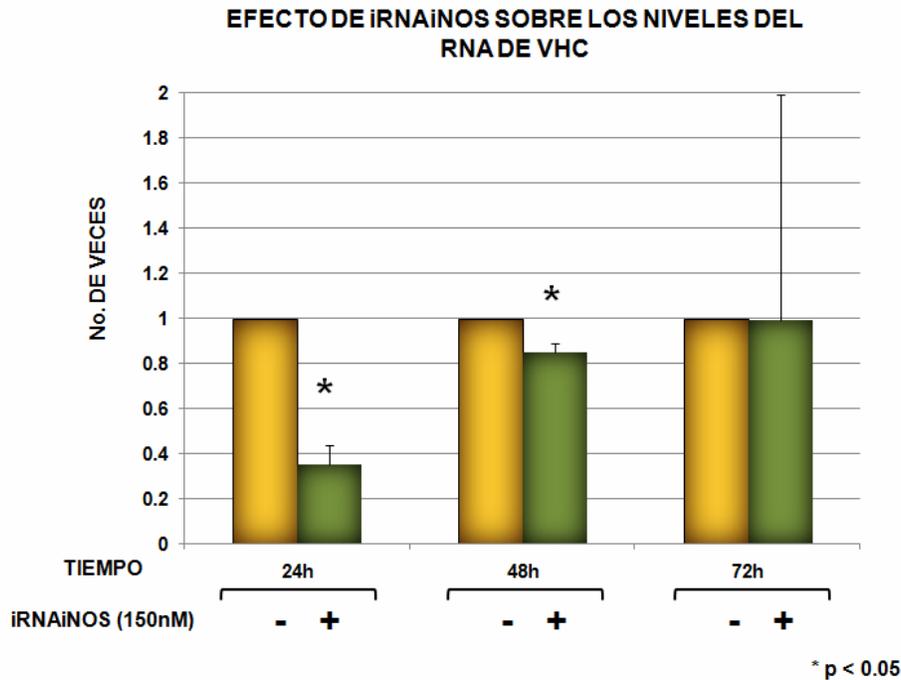


Figura 25. Controles de transfección (GAPDH y non-sense).

Al transfectar las células con el iRNA-iNOS confirmamos el silenciamiento de iNOS a las 24, 48 y 72h (Figura 26) y al cuantificar los niveles de RNA de VHC durante el silenciamiento de iNOS encontramos una reducción en la expresión de VHC a las 24 y 48h (Figura 27). Cabe señalar que este hallazgo comulga con lo observado con AAS ya que puede reducir la expresión de iNOS y al mismo tiempo disminuir los niveles de RNA de VHC.



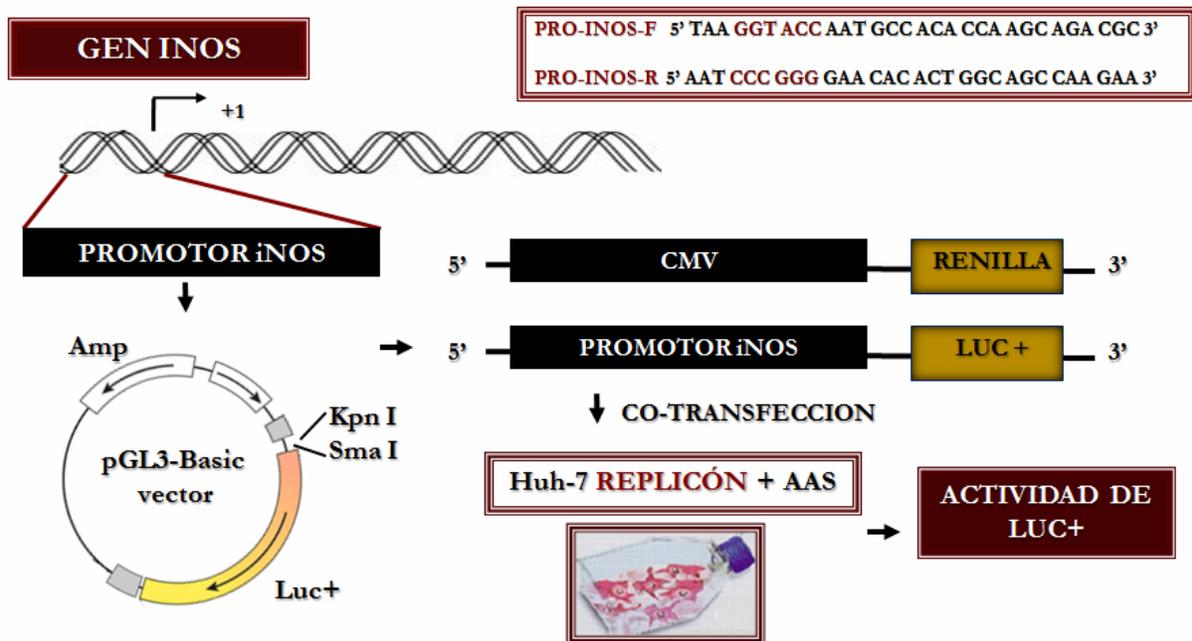
**Figura 26.** Silenciamiento de iNOS mediante un sistema de iRNA.



**Figura 27.** La sub-expresión de iNOS reduce los niveles de RNA de VHC.

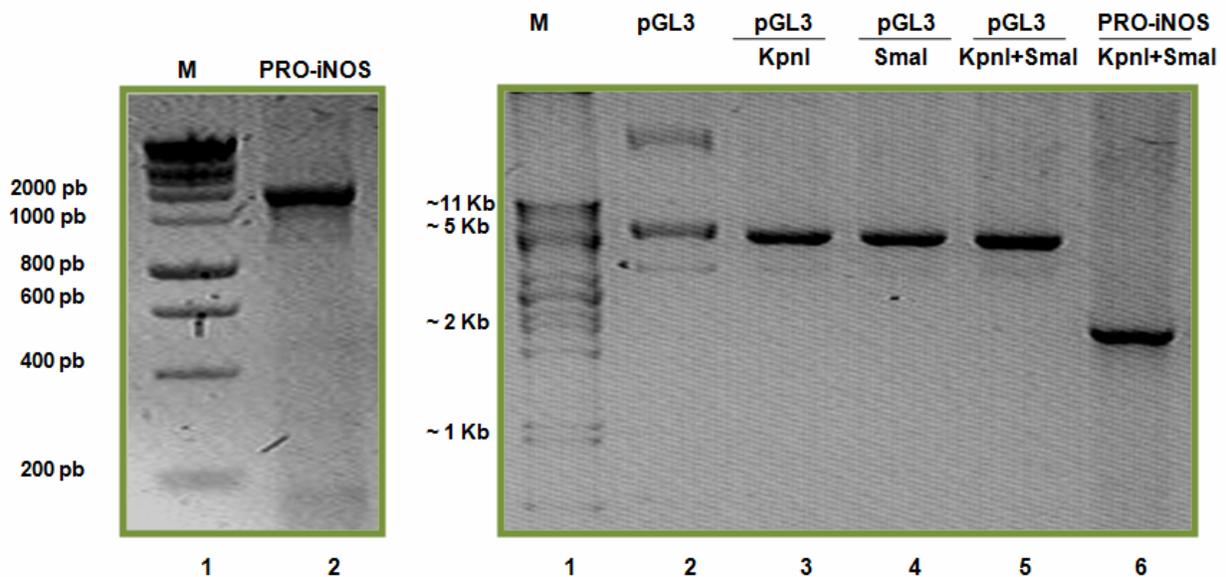
## 7.6 AAS INHIBE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE iNOS.

Con el propósito de analizar la participación de AAS sobre la actividad del promotor de iNOS se amplificó la secuencia del promotor de iNOS y posteriormente fue clonado en el vector expresión comercial pGL3 basic el cual contiene el gen reportero de luciferasa (Luc+). Una vez clonado el promotor en el plásmido este fue con-transfectado con un constructo que expresa el gen reportero de renilla cuya expresión es dirigida por el promotor de CMV (Figura 28).



**Figura 28.** Estrategia general para la clonación del promotor de iNOS en un vector de expresión y análisis de la participación de AAS sobre la actividad del promotor de iNOS.

## PROMOTOR DE iNOS

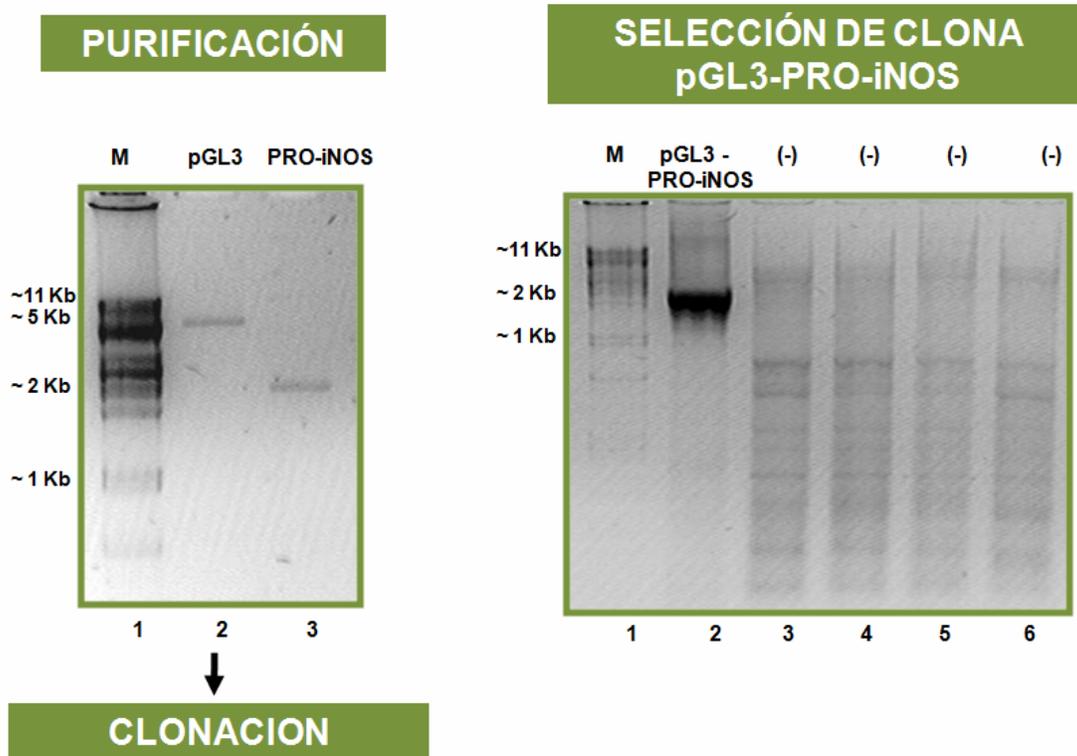


**Figura 29.** Amplificación y caracterización del promotor de iNOS.

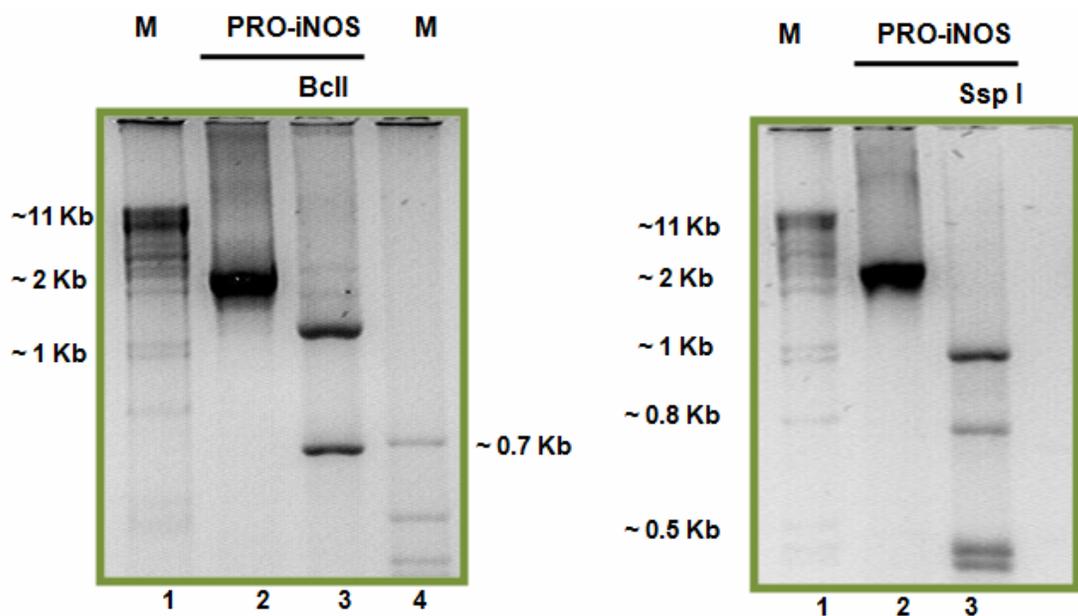
---

---

La secuencia correspondiente al promotor de iNOS con una longitud de ~2Kb fue amplificada con un juego de primers específicos y el producto se purificó para después realizar una digestión con las enzimas de restricción KpnI y SmaI; de forma simultánea se digirió el vector pGL3 (Figura 29). Los productos fueron purificados y posteriormente ligados. Al terminar la clonación se transformaron bacterias *E. coli* y se hizo la selección de clonas positivas para bacterias positivas para el plasmido con el pro-iNOS (Figura 30). El promotor fue caracterizado con las enzimas de restricción BclI y SspI cuyas bandas corresponden al patrón teórico esperado (Figura 31).

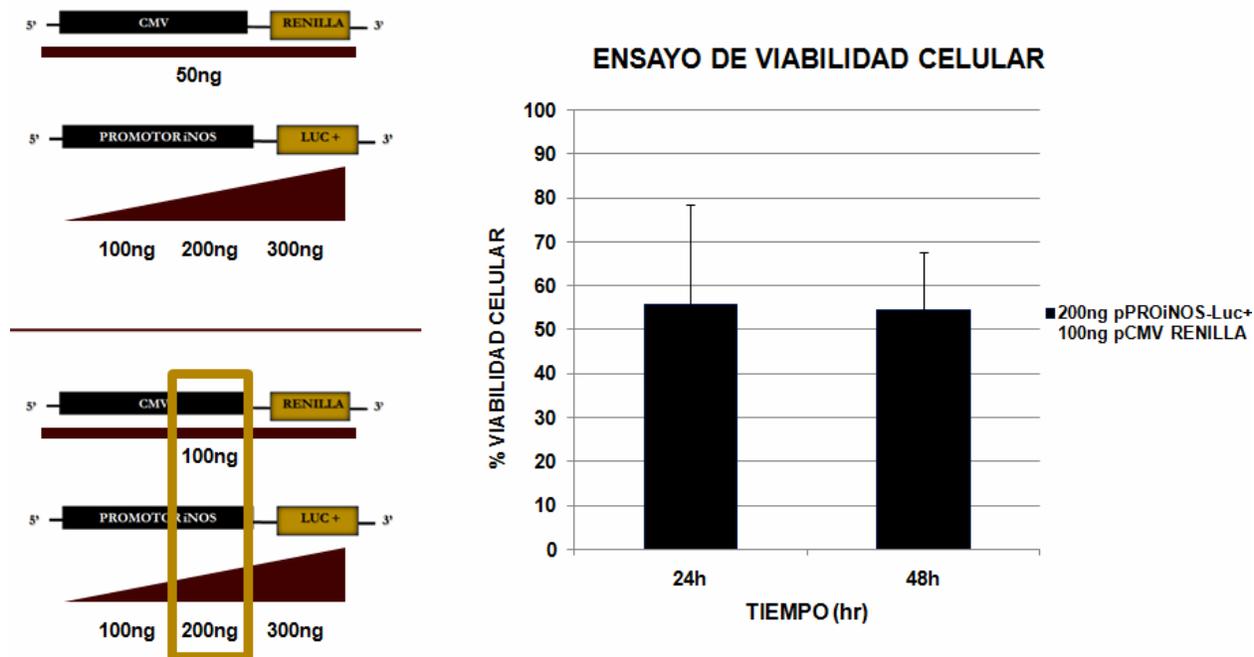


**Figura 30.** Selección de clonas positivas para pGL3.PRO-iNOS.



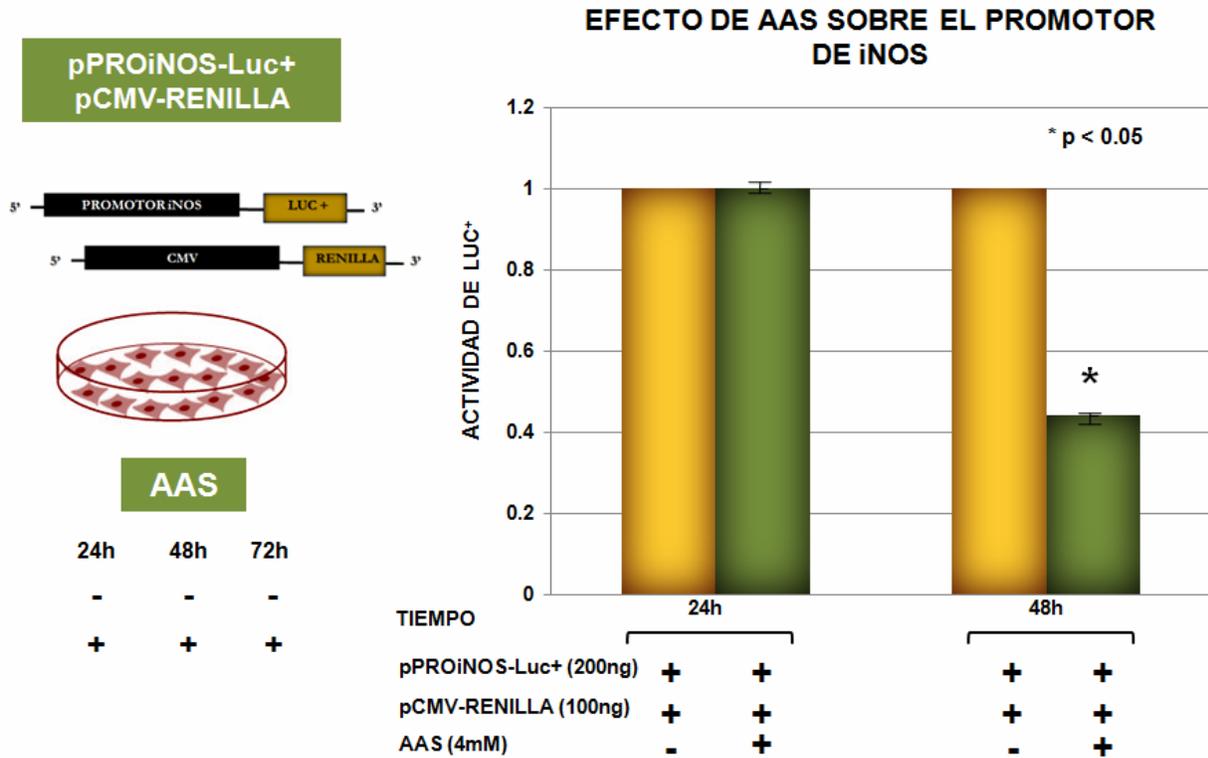
**Figura 31.** Caracterización del promotor de iNOS.

Una vez listo el plásmido se estandarizó la cantidad de constructo para renilla y luciferasa utilizando 6 juegos diferentes de concentraciones. Para renilla 50 y 100ng y para Luc 100, 200, 300ng. Al final se eligieron 100ng de renilla y 200ng de luciferasa ya que con estas cantidades se obtuvo la mejor señal detectada por el luminómetro. Previo al experimento de co-transfección y a la exposición con AAS, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular (Figura 32).



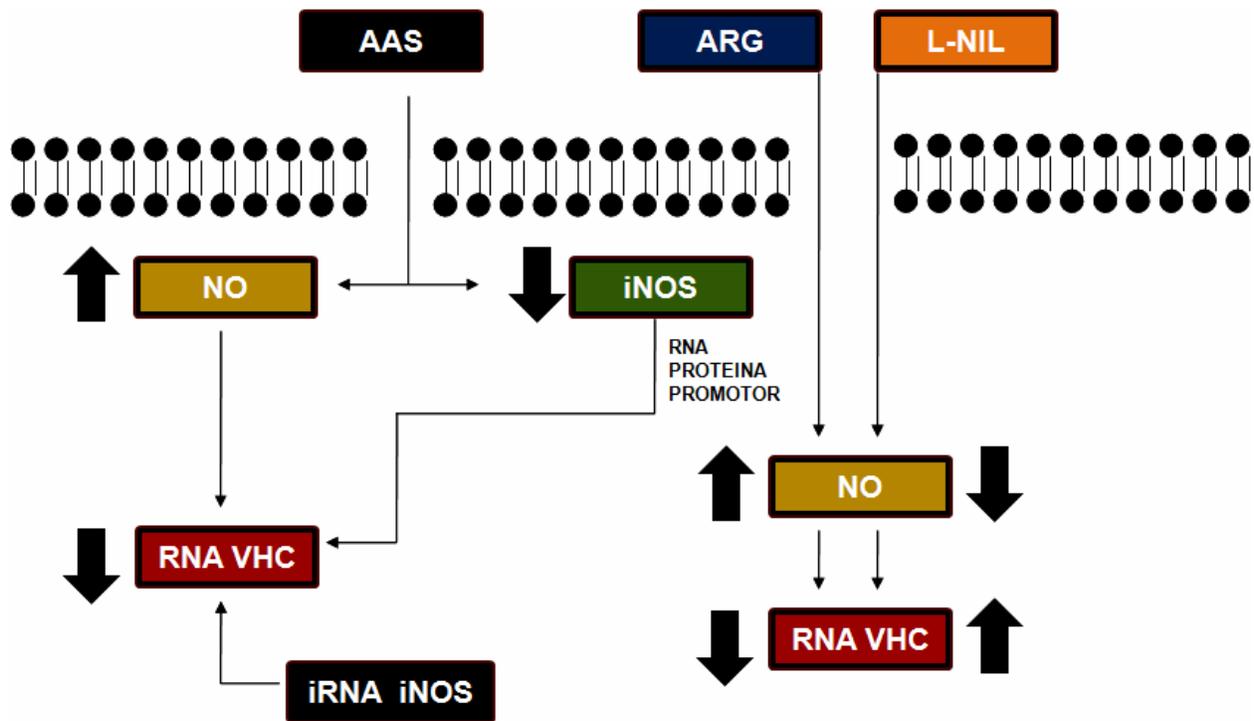
**Figura 32.** Ensayo de viabilidad celular para la co-transfección de pPROiNOS-Luc + PCMV Renilla

Células Huh-7-VHC-replicón fueron co-transfectadas con pPROiNOS-Luc + PCMV Renilla y 6 h posterior a la transfección se hizo la exposición a AAS a 2 diferentes tiempos (24 y 48h). Al analizar los resultados encontramos que AAS puede reducir la actividad del promotor hasta un 60% (Figura 33).



**Figura 33.** AAS reduce la actividad del promotor de iNOS en células Huh-7-VHC-replicón

Con base a los resultados hasta este punto, resumimos lo siguiente: AAS incrementa la concentración de NO y paradójicamente inhibe la expresión de iNOS a nivel de RNA y proteína. El silenciamiento de iNOS reduce los niveles de RNA de VHC (Figura 34).



**Figura 34.** Efecto de AAS sobre la expresión de iNOS a nivel transcripcional y traduccional.

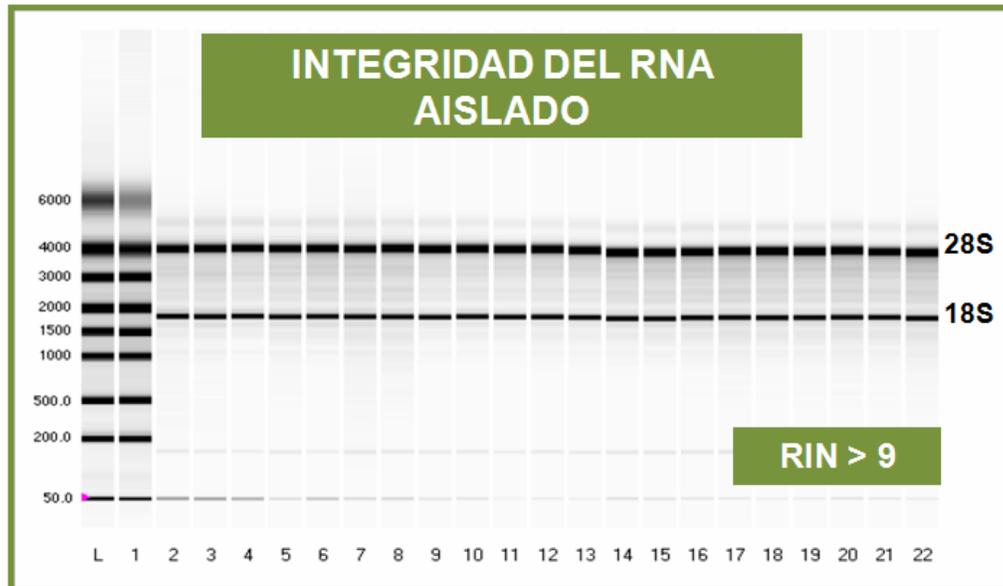
## 7.7 FIRMA TRANSCRIPSIONAL DE HUH-7 EN PRESENCIA DE AAS.

Finalmente, para identificar los genes involucrados en la vía de señalización activada durante el efecto antiviral de AAS sobre VHC se realizó un análisis de expresión transcripcional mediante microarreglos.

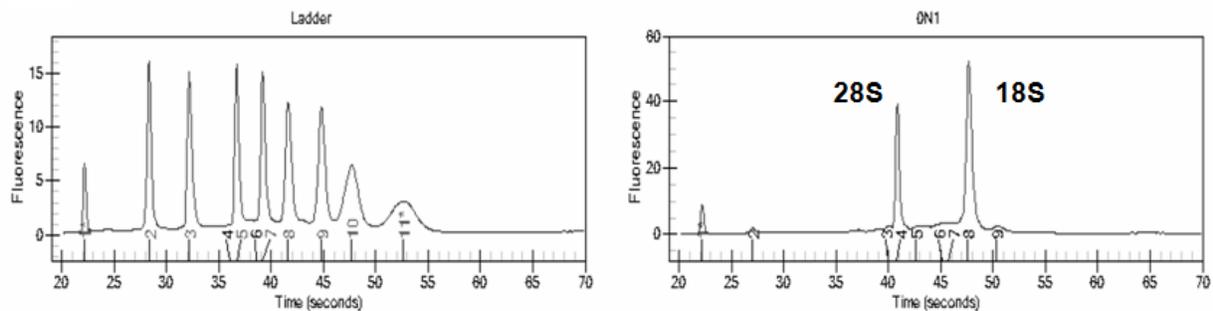
En una primera etapa de validación y para confirmar la integridad y calidad del RNA aislado este se evaluó con el bioanalizador de Biorad Expirion, con el cual se puede realizar electroforesis capilar. En el patrón virtual de la electroforesis se observan bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28 y 28S (Figura 35 A). En el primer electroferograma aparecen los picos correspondientes al marcador de peso molecular y en el segundo se observan los picos derivados de las subunidades 28 y 18S con tiempos de retención entre 42 y 48 seg (Figura 35 B). La unidad de medición

de la integridad del RNA se denomina RIN y esta debe ser mayor a 6,2. En nuestras muestras el RIN fue mayor a 9 por lo que se consideraron con alta calidad.

**A**

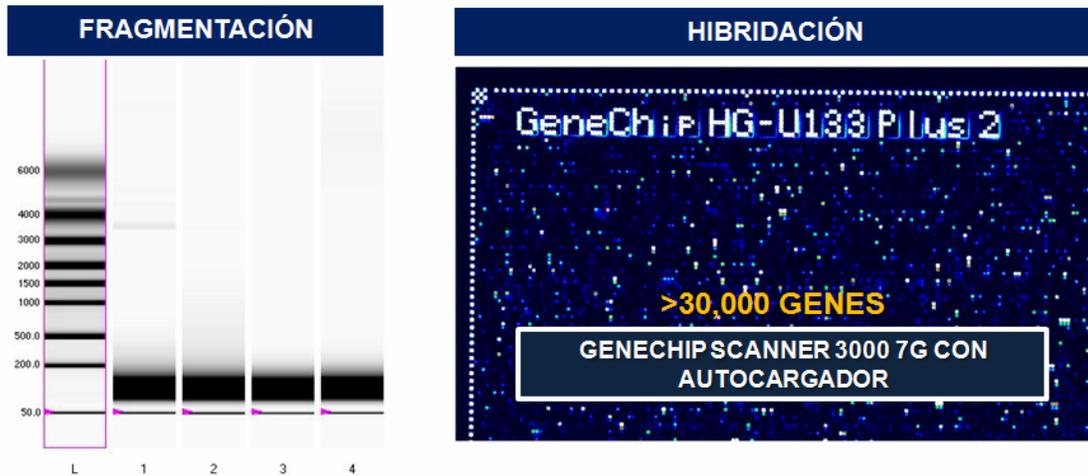
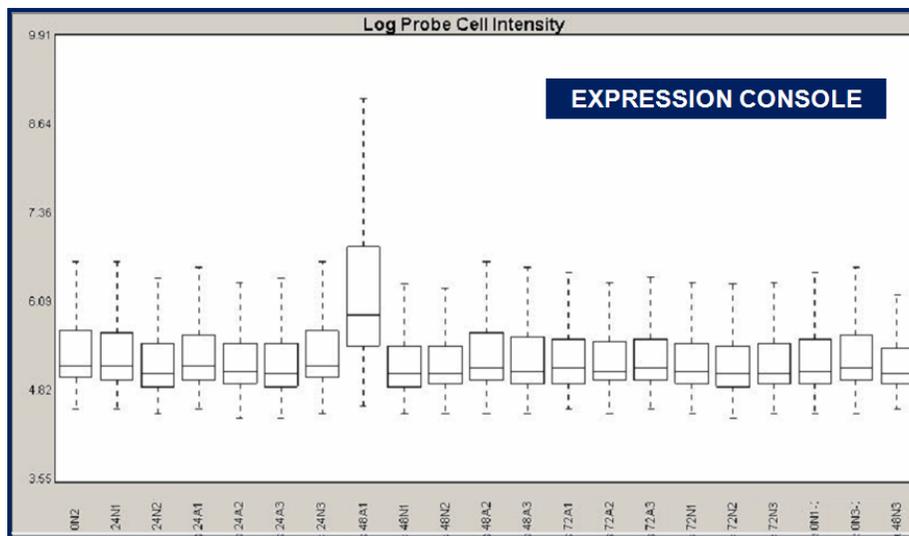


**B**



**Figura 35.** Electroforesis capilar de los extractos de RNA derivados de células Huh-7-VHC-replicación expuestos a AAS.

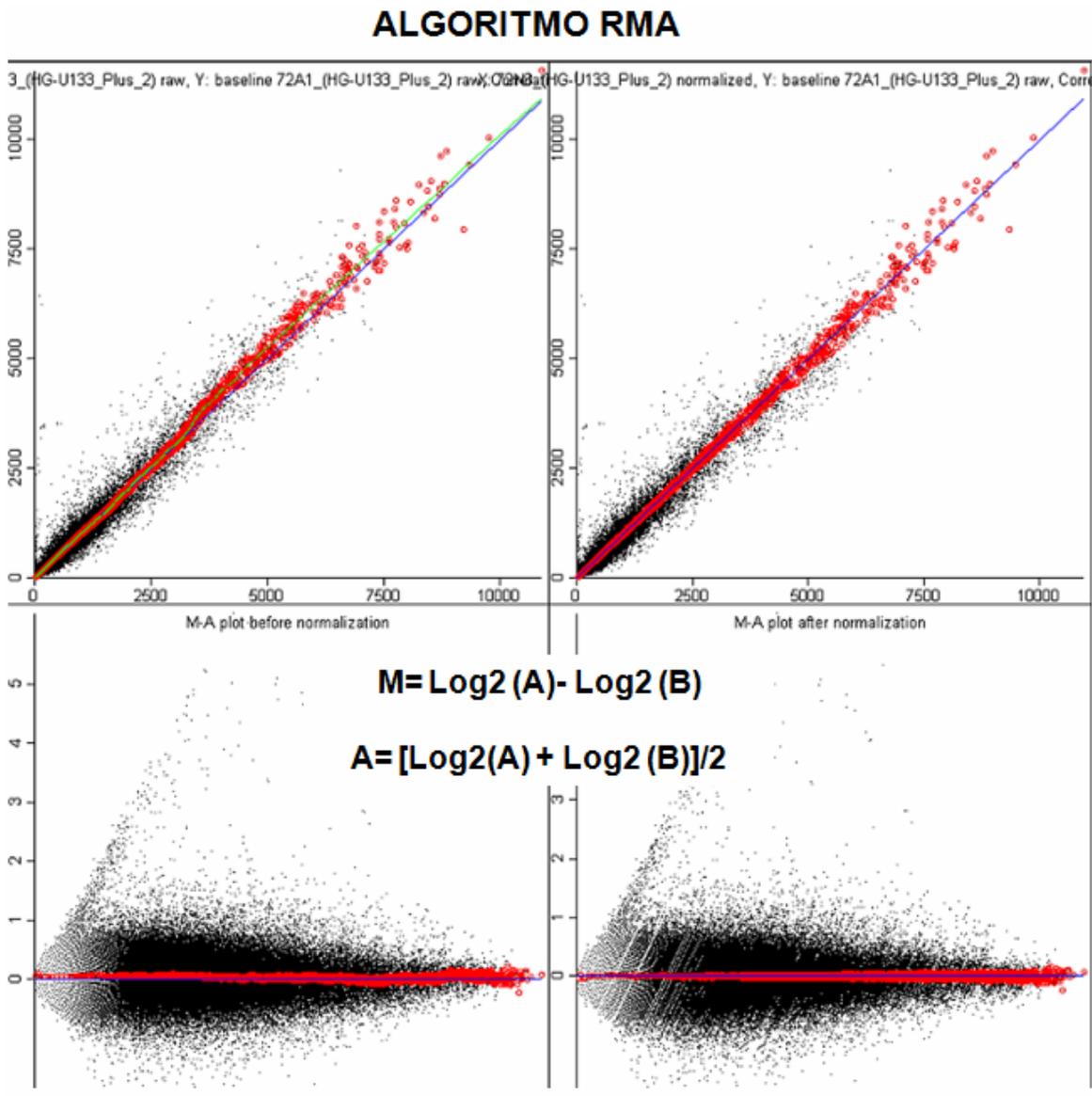
En una segunda etapa de validación y posterior a la transcripción *in vitro* y al marcaje con biotina, las muestras fueron fragmentadas. Para corroborar la obtención de fragmentos con una longitud menor a 200 bases se realizó nuevamente una electroforesis capilar. En la Figura 36 A muestro 4 de las 21 muestras procesadas. Una vez confirmada la fragmentación, los productos fueron hibridados en los chips de expresión U133 (Affimetrix) plus los cuales contienen más de 30,000 sondas incluyendo controles que sirvieron posteriormente para normalizar los resultados.

**A****B**

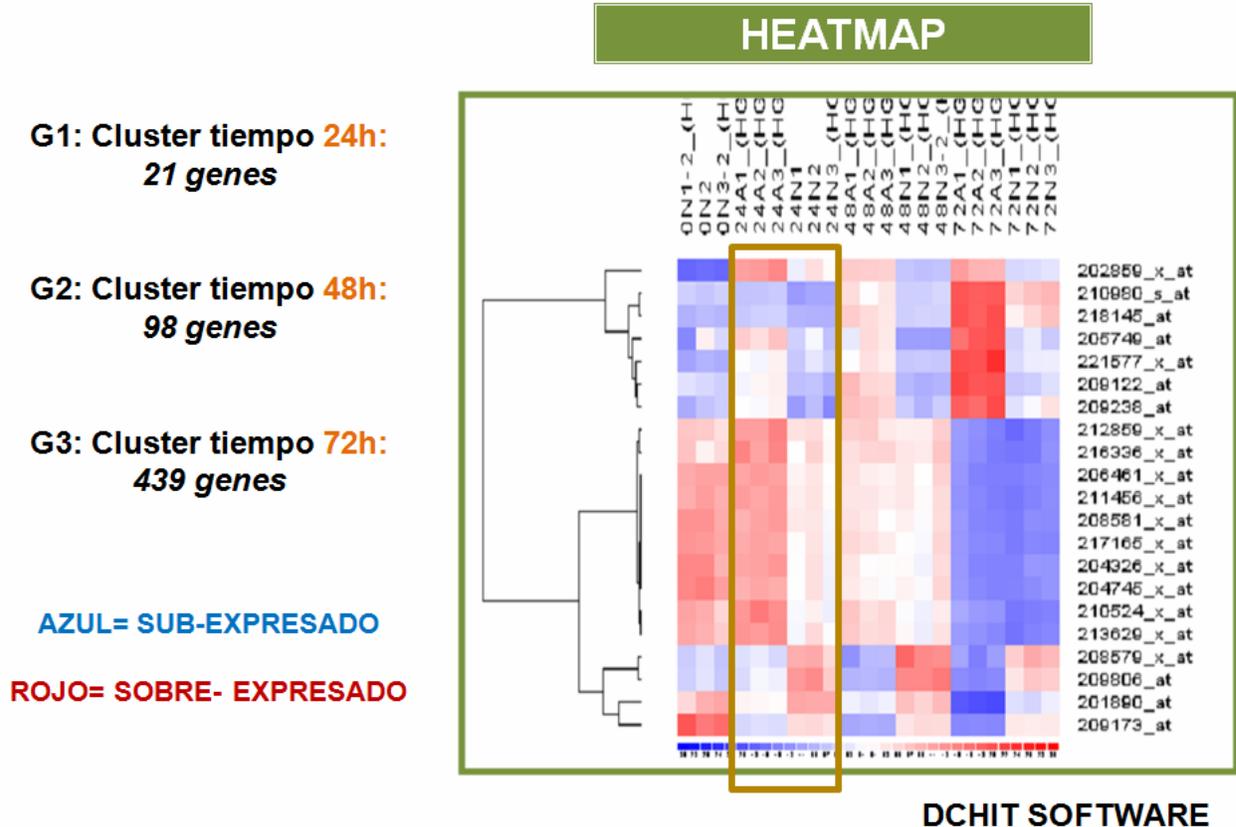
**Figura 36. A.** Fragmentación e Hibridación. El scanner convierte la imagen análoga de un microarreglo en una imagen digital (píxeles). **B.** Se construyó un gráfico de box-plot como una medida de normalización de la dispersión de cada componente en el microarreglo.

La señal fluorescente proveniente de un chip y capturada con el Scanner Gen Chip 3000 7G con autocargador. Cada chip fue normalizado con los genes controles. En el gráfico de box plot se colocó en el eje de las Y los valores de fluorescencia transformados a Log2. Al realizar el análisis con el Software Expression Console todos los valores se encontraron dentro de los límites permitidos para realizar la interpretación de sub y sobre expresión (Figura 36 B).

La mediana global del análisis anterior se usó como eje central para construir gráficos de scatter plot, los cuales sirvieron como una segunda normalización. Los gráficos superiores se construyeron con los valores de fluorescencia de sub (Y) y sobreexpresión(X). Los valores se distribuyen a lo largo de una recta con pendiente=1. Al transformar a Log2 los resultados y utilizando el algoritmo RMA (Robust Microarray Analysis) se arman los gráficos inferiores los cuales permiten observar la diferencia y promedio de los valores sub y sobre expresados (Figura 37).



**Figura 37.** Algoritmo RMA. Valores de expresión absolutos en escala logarítmica ( $\log_2$ ) que oscilan aproximadamente entre 2 para las intensidades menores y 14 para las intensidades mayores.



**Figura 38.** Perfil transcripcional de células Huh-7-VHC-replicón expuestas a 4mM de AAS.

Una vez concluida la normalización y con ayuda del Software Dchit se obtuvieron heat maps y mapas jerárquicos que permitieron identificar genes diferencialmente expresados. A las 24h se encontraron 21 genes, a las 48h 98 genes y a las 72h 439 genes. Como punto de partida para nuestro estudio, nos centramos en los 21 genes diferencialmente expresados a las 24h (Figura 38), resultando relevantes para nuestro proyecto de investigación Interleucina-8, Citocromo P450, ribonucleótido reductasa y metalotioneínas, ya que están asociadas con eventos de anti-oxidación (Tabla 2).

GENES SOBRE EXPRESADOS POR AAS	LOCALIZACIÓN CROMOSOMICA
INTERLEUCINA-8	4q13-q21
CITOCROMO P450 1A1	15q24.1
METALOTIONEÍNAS 1E,F,G,H,X	16q13

GENES SUB EXPRESADOS POR AAS	LOCALIZACIÓN CROMOSOMICA
RIBONUCLEÓTIDO REDUCTASA	2p25p24

**Tabla 2.** Genes diferencialmente expresados en células Huh-7-VHC-replicón expuestas a AAS.

---

---

## CAPITULO VIII

### 8. DISCUSIÓN

La elucidación de la vía de señalización activada por el AAS, con efecto inhibitorio sobre el VHC, permitirá identificar nuevos puntos de control en el ciclo biológico del virus, para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que dirijan la erradicación de la infección.

En este estudio observamos que el AAS induce la producción del NO en células Huh-7-VHC-replicón. Estos resultados sugieren que el NO podría estar involucrado en la regulación negativa del AAS sobre el VHC, en particular, si consideramos que al NO se le han atribuido propiedades antivirales sobre ciertos virus como Epstein Barr, Dengue y VIH<sup>227-229</sup>.

El VHC genera estrés oxidativo en retículo endoplásmico al incrementar la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando con ello la inhibición de la vía de señalización activada por INF- $\alpha$ . Sin embargo, cuando el NO reacciona con ROS produce peroxinitritos, los cuales son altamente tóxicos para bacterias, levaduras, virus y otros patógenos<sup>220</sup>.

Para elucidar si el AAS es capaz de elevar los niveles del NO en células hepáticas, se expusieron células Huh-7-VHC-replicón a 4mM de AAS a 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) y se encontró un incremento dependiente del tiempo de hasta 2.7 veces ( $p \leq 0.05$ ) a las 72 h de exposición, lo cual confirma el potencial del AAS como inductor de la producción del NO. Paradójicamente, al analizar el nivel de expresión de iNOS en presencia del AAS, observamos que el tratamiento disminuye los niveles de iNOS-RNA significativamente, hasta 85% ( $p \leq 0.05$ ) a las 48h y 20% ( $p$ , NS) en la cantidad de iNOS-proteína a las 72 h post-tratamiento.

Como un parámetro control se midieron los niveles del NO e iNOS-RNA en células expuestas a 1000  $\mu$ M de arginina o 250  $\mu$ M de L-NIL (inductor e inhibidor de NO) y corroboramos una elevación en los niveles del NO y en el RNA de iNOS en células expuestas a arginina, equivalente a dos órdenes de magnitud ( $p \leq 0.05$ ); mientras que

---

---

L-NIL redujo la producción de NO (30%,  $p \leq 0.05$ ) y la expresión de iNOS a nivel transcripcional en un 70% ( $p \leq 0.05$ ).

Como marcador de estrés nitrosativo se seleccionó a las proteínas con residuos de nitrotirosina y con base a los resultados experimentales podemos sugerir que el AAS cumple un papel ambiguo en el balance redox (reducción-oxidación) ya que ha sido reportado previamente un efecto antioxidante promovido por AAS; no obstante, basado en nuestros resultados, el AAS también es capaz de incrementar la nitración de residuos de tiroxina por medio la acción de peroxinitritos en una reacción catalizada por superóxido dismutasa (SOD).

Con el propósito de investigar la participación del NO como intermediario en la disminución de la expresión de VHC a nivel transcripcional se trataron células Huh-7-VHC-replicón con 1000  $\mu$ M de arginina para incrementar la síntesis de NO. Nuestros resultados muestran un descenso del 41% en los niveles del RNA viral ( $p \leq 0.05$ ) a las 24 horas posteriores al tratamiento. Como contra parte, a las 72 h post-tratamiento los niveles de RNA de VHC-replicón, incrementan más de 1.44 veces sobre su estado basal. Este fenómeno podría atribuirse a un aumento en la expresión de arginasas, posiblemente inducido por el complejo de replicación viral regulado por NS5A y NS5B<sup>231</sup>.

Recapitulando, el AAS, incrementa los niveles de NO en células de hepatocarcinoma, reduce la expresión transcripcional de iNOS y aumenta la cantidad de residuos de tirosina nitrados en células Huh-7-VHC-replicón, lo que sugiere que las especies reactivas de nitrógeno pueden ser reguladas por el AAS.

Para esclarecer si iNOS tiene un efecto relevante sobre la replicación del VHC, se utilizó un sistema de iRNA dirigido contra iNOS. Para ello, células Huh-7-VHC-replicón fueron transfectadas con 150nM de iNOS-iRNA y bajo esta concentración se logró un efecto inhibitorio sobre el VHC-replicón (70%,  $p \leq 0.05$ ) a las 24 h post-transfección.

Estos resultados muestran una estrecha correlación entre el efecto obtenido con el AAS e iNOS-RNA, ya que ambos tratamientos inhiben la replicación del virus. Ahora

---

---

bien, el VHC *per se* induce la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, provocando la nitración y oxidación de proteínas celulares lo que conduce a daño hepático<sup>232</sup>. Estudios recientes en nuestro grupo de investigación sugieren un potencial efecto anti-oxidante del AAS, sustentado en la capacidad de este principio activo para incrementar la expresión de SOD. Por lo tanto, las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno pueden ser consideradas importantes blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas estrategias anti-virales.

Posteriormente, fue de nuestro interés analizar la participación del AAS sobre la actividad del promotor de iNOS, partiendo del antecedente de la capacidad del salicilato de sodio para ejercer un efecto supresor (bajo concentraciones farmacológicas) en la expresión de iNOS al bloquear la actividad de CCAAT/Enhancer Binding Protein- $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) en macrófagos<sup>233</sup>.

La secuencia completa (~2Kb) del promotor de iNOS aislada de Huh-7, fue clonada en el vector comercial PGL3 basic que contiene el gen reportero de Luciferasa para obtener el constructo pPROiNOS-Luc<sup>+</sup>, el cual fue co-transfectado con el plásmido pCMV-Renilla en células Huh-7-VHC-replicón. Los resultados muestran un descenso en la actividad del promotor de iNOS a las 48 h post-tratamiento con 4mM de AAS (60%,  $p \leq 0.05$ ). Para identificar posibles elementos transcripcionales asociados al efecto inhibitorio del AAS, será necesario caracterizar por secuenciación el promotor de iNOS.

Adicionalmente, en la búsqueda de nuevos blancos moleculares durante el efecto inhibitorio del AAS sobre el VHC, obtuvimos un perfil diferencial de expresión en células expuestas a AAS versus un control sin tratamiento, mediante microarreglos de cDNA.

Se identificaron genes estrechamente relacionados a estrés oxidativo, entre ellos CYP450, IL-8, Metalotioneínas y Ribonucleótido Reductasa.

El incremento de estrés oxidativo en células infectadas por el VHC, está asociado con el Citocromo P450 (CYP450), el cual tiene una alta capacidad para generar ROS<sup>234</sup>. CYP450, recibe en su dominio oxidasa electrones transferidos por NADPH a través de iNOS para llevar a cabo la oxidación de L-arginine a L-citrulina para producir NO<sup>235</sup>.

---

---

Este proceso es patofisiológicamente significativo porque causa incremento de daño oxidativo sobre ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, debido a la formación de peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ )<sup>236</sup>. El AAS induce la expresión transcripcional de CYP450, lo que explica el aumento en la concentración de NO en células Huh-7-VHC-replicón expuestas a AAS.

Ribonucleótido Reductasa (RR) regula factores génicos estrechamente relacionados con crecimiento celular, diferenciación y apoptosis<sup>237</sup>. RR, reduce los nucleósidos difosfato (ADP, GDP, CDP y UDP) a su formas desoxi (dADP, dGDP, dCDP y dUDP), utilizando como donador inmediato de electrones a tioredoxina (proteína tiólica)<sup>238</sup>.

Un incremento en los niveles de tioredoxina en suero se ha correlacionado con la progresión a fibrosis hepática<sup>239</sup>. Por otra parte, NO es capaz de bloquear la actividad de RR para inhibir la replicación celular<sup>240</sup>. Este antecedente, coteja con la sub-expresión de la ribonucleótido reductasa en presencia de AAS, que es capaz de estimular la producción de NO en nuestro modelo de estudio.

Las metalotioneínas (MTs) constituyen una familia de proteínas ricas en cisteínas, sus grupos tiol (-SH) tienen la capacidad de unirse a metales pesados tanto fisiológicos (zinc, cobre, selenio) como xenobióticos (cadmio, mercurio, plata y arsénico)<sup>241</sup>. Los residuos de cisteína de las MTs pueden capturar radicales oxidantes, como superóxido e hidroxilo, por lo que es considerado un mecanismo importante en el control del estrés oxidativo<sup>242</sup>. La capacidad antioxidante del AAS se ve respaldada con la sobre-expresión de las MTs, en nuestro hallazgo experimental.

El AAS, estimuló la expresión de Interleucina 8 (IL-8) en nuestro modelo celular (Huh-7-VHC-replicón). La IL-8, es una citocina pro-inflamatoria que contribuye en el fortalecimiento celular ante infecciones virales como el VIH, ya puede inhibir la replicación del virus en los linfocitos CD4+<sup>243</sup>. IL-8 induce la producción del IFN- $\gamma$ , la cual estimula la actividad de iNOS para la síntesis de NO<sup>216</sup>.

---

---

Finalmente, nuestros resultados sugieren que NO participa en la regulación del efecto antiviral de AAS sobre la expresión de VHC e hipotetizamos que las especies reactivas de nitrógeno, pueden alterar el ciclo biológico del virus a través de la S-nitrosilación de proteínas involucradas en la replicación, transcripción y/o traducción. Con base a lo anterior, la modulación de NO a nivel farmacológico, podría contemplarse como una nueva terapia adyuvante en el tratamiento contra VHC.

---

---

## CAPITULO IX

### CONCLUSIONES

- Nuestros resultados sugieren que el NO participa en la regulación del efecto antiviral del AAS sobre la expresión del VHC.
- La reducción de la expresión del RNA de iNOS en presencia de AAS corrobora con los tiempos de disminución de la replicación del VHC.
- El silenciamiento de iNOS induce un descenso en la replicación del VHC.
- El AAS tiene la capacidad de reducir la actividad del promotor de iNOS en células de hepatocarcinoma.
- La exposición al AAS promueve la sub-expresión y sobre-expresión de genes con función antioxidante como metalotioneína, lo cual podría estar directamente relacionado con la disminución de la replicación del VHC observada en nuestro modelo de estudio.

---

---

## CAPITULO X

### 10. APENDICE

#### 10.1 CULTIVO CELULAR

1. Retirar el medio de cultivo de células Huh-7 replicón o parental confluentes en un 90%.
2. Lavar las células contenidas con 5 mL de PBS 1X para una botella de 75 cm<sup>2</sup> estéril y con 2 mL para una de de 25 cm<sup>2</sup>.
3. Para desprender las células de la superficie de la botella la monocapa de una botella agregar 2 mL de tripsina y para una de 25 cm<sup>2</sup> 1 mL.
4. Incubar a 37°C durante 5-10 minutos.
5. Neutralizar la tripsina agregando el mismo volumen de medio suplementado con SBF y transferirlo a un tubo falcon de 15 mL.
6. Centrifugar a 1,000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Retirar sobrenadante (medio-tripsina).
8. Agregar 2-4mL de medio de cultivo para resuspender el botón. Mezclar con cuidado para homogenizar.
9. Tomar el volumen de células previamente contadas o estimadas y agregarlas a una botella de 75 cm<sup>2</sup> que contenga 9 mL de medio ADMEM suplementado (2% suero bovino fetal, 1 % antibiótico: penicilina/estreptomicina, 1% glutamina, 1% aminoácidos no esenciales) y para una botella de 25 cm<sup>2</sup> agregar 5mL.
10. Incubar a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta obtener 90% de confluencia.

#### 10.2 CUENTA CELULAR

1. Realizar una dilución 1:8 como se muestra utilizando 60uL de medio de cultivo, 10 uL de azul tripano y 10 uL de alícuota celular.
2. Tomar 10 µL de la mezcla y colocarla en una cámara Neubauer.

- 
- 
3. Realizar el conteo con el objetivo de 10 X.
  4. Contar el número de células en los cuadrantes externos y posteriormente calcular el promedio y compararlo con el conteo del cuadrante central (deben ser semejantes).
  5. Células por mL= (promedio)(8)(10,000); donde 8 es el factor de dilución y 10,000 el factor de conversión de la cámara.

### **10.3 CONGELACIÓN DE CÉLULAS REPLICÓN Y PARENTAL**

1. Retirar el medio de cultivo. Lavar el frasco de 75 cm<sup>2</sup> con 5 mL de PBS 1X. Retirar el PBS.
2. Añadir 2 mL de tripsina. Incubar 5 min a 37°C. Recuperar las células tripsinizadas y colocarlas en un tubo falcon de 15 mL.
3. Centrifugar a 1,000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Las células obtenidas de una botella de 75 cm<sup>2</sup> con 90 % de confluencia, servirán para preparar 3-4 crioviales de 1 mL c/u con 90% de suero y 10 % de DMSO conteniendo de 1.5-2.0 millones de células.
5. Congelar primeramente a -20°C durante 2 h y finalmente almacenar hasta por un año a -80°C.

### **10.4 CONCENTRACIÓN DE NO<sub>2</sub><sup>-</sup>**

1. Mezclar 100 uL de medio de cultivo suplementado (blanco) o 100 uL de medio derivado de un cultivo celular (muestra), con 200 uL de acetonitrilo grado analítico.
2. Homogenizar con vortex durante 30 seg.
3. Centrifugar 9,000 rpm por 30 min.
4. Recuperar sobrenadante.
5. Evaporar el solvente con ayuda de un SAVANT (3- 4 horas).
6. Reconstituir la muestra en 100 uL de H<sub>2</sub>O mili Q, medio de cultivo o el solvente de elección.

---

---

#### 10.4.1 MANEJO DEL EQUIPO SAVANT

1. Encender el equipo refrigerante 1 hora antes de encender el rotor.
2. Colocar las muestras (tubos eppendorf (1.5 o 2 mL) destapados en el carrusel).
3. Cerrar la tapa del SAVANT .
4. Abrir la llave de vacío (posición paralela a la manguera= abierto).
5. Encender Rotor. Mantener en “off” la función heater.
6. Activar vacío.
7. Para apagar el equipo: a) desactivar vacío, b) apagar rotor y c) equipo refrigerante.

**NOTA:** Para monitorear grado de evaporación basta cerrar la llave de vacío y posteriormente apagar el rotor. Para poner en marcha el equipo encender primeramente el rotor y al final abrir la llave de vacío.

#### 10.5 CUANTIFICACIÓN INDIRECTA DE NO MEDIANTE HPLC-FLUORESCENCIA

1. Mezclar 1mg de 2'-3' diaminonaftaleno (DAN) con 1mL de HCL 0.62M.
2. A 100uL de muestra agregar 10uL de DAN para su conversión a 2'-3' naftotriazol (NAT) (molécula fluorescente),
3. Incubar a 27°C en un baño durante 10 min.
4. Añadir 5uL de NaOH 2.8M. Transferir a un inserto 100uL de la mezcla final.
5. Realizar la inyección en el equipo de HPLC utilizando un flujo de 1mL por minuto y una fase móvil de buffer de fosfatos:metanol (50:50) bajo condiciones isocráticas.
6. Seleccionar 375 y 415nm como longitudes de ondas de excitación y emisión respectivamente.

Para definir la concentración de NO se preparó una curva estándar de referencia de  $\text{NO}_2^-$  (125-1000pM), y se validó mediante regresión lineal [ $y= mx + b; r^2$ ] y coeficiente de variación para definir precisión [%CV= (SD/media) (100)].

---

---

## 10.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS MEDIANTE BRADFORD

NOTA:

Utilizar placas de 96 pozos (evitar placas para ELISA ya que el potencial electrostático del material impide la reutilización de los pozos; se recomienda trabajar con placas para cultivo celular).

### CURVA DE CALIBRACIÓN

1. Preparar un stock de 100 mg/mL de BSA y posteriormente realizar una dilución para obtener un estándar de 1 mg/mL BSA (1,000 ug/mL).
2. A partir del estándar de 1,000 ug/mL preparar una curva de calibración considerando las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 30 y 40 ug/mL.
3. A cada pozo se le añade el volumen correspondiente de H<sub>2</sub>O mili Q y la cantidad de estándar de BSA (1,000 ug/mL) necesarias para obtener el rango de concentraciones previamente marcado en un volumen de 160 uL.
4. Colocar 40 uL de reactivo Bradford a cada muestra.
5. Leer a 595 ó 600 nm en un lector de placa.

### MUESTRAS

6. Colocar 1 uL de muestra diluida previamente (1:5) en 159 uL de H<sub>2</sub>O mili Q y 40 uL de reactivo Bradford.

NOTA: Los factores de dilución son: **200** (correspondiente al 1uL contenido en los 200 uL de reacción) y **5** (atribuido a la dilución de la muestra 1:5). Por lo tanto, el factor de dilución final es de **1,000**. Ejemplo: al tiempo 0 h  $cc = 11.12 \text{ ug/mL} (1,000) = 11,120 \text{ ug/mL} = 11.20 \text{ ug/uL}$ .

## 10.7 WESTERN-BLOT

1. Preparar un gel de poliacrilamida con dos concentraciones; la inferior con 10% (gel separador) y la superior con 5% (gel concentrador).
2. Cargar 50ug de proteína previamente desnaturalizada a 95° C durante 4 min.
3. Realizar la electroforesis durante 2 h a 80V.
4. Activar durante 5 min con metanol, la membrana a la cual serán transferidas las proteínas.

- 
- 
5. Lavar la membrana con agua destilada y equilibrarla con buffer de transferencia 1X.
  6. Empalmar filtros, esponja, membrana y gel con el siguiente orden de abajo hacia arriba:  
BASE NEGRA - ESPONJA - PAPEL FILTRO - GEL - MEMBRANA - PAPEL FILTRO - ESPONJA - BASE BLANCA
  7. Realizar la transferencia a 4° C a 100V durante 1h o bien, a 30V toda la noche.
  8. Teñir la membrana con el reactivo de ponceou para colorear transitoriamente las proteínas y el marcador de peso molecular y así corroborar una transferencia exitosa.
  9. Remover el reactivo de ponceou con buffer de lavado PBS-tritón 1X.
  10. Sumergir la membrana en el buffer de bloqueo (leche o BSA) durante 1h a 4° C. con agitación.
  11. Lavar la membrana con PBS-tritón 1X un par de veces durante 10 min.
  12. Incubar la membrana con el anticuerpo primario diluido 1:1000 durante toda la noche.
  13. Lavar 5 veces por 10 min con el buffer PBS-tritón 1X.
  14. Colocar el anticuerpo secundario diluido 1:1000. Incubar a 4° C durante 2 horas.
  15. Lavar 5 veces por 10 min con el buffer PBS-tritón 1X.
  16. Revelar mediante Quimioluminiscencia la señal de la proteína de interés.

## 10.8 TRANSFECCIÓN DE iRNA iNOS

1. Sembrar 16 h previas a la transfección 40,000 células en placas de 24 pozos con ADMEM y 2 % de SBF.
2. Preparar el agente transfectante (siPORT lipid) y el iRNA de la siguiente forma:
  - Por pozo mezclar 1.25uL de siPORT Lipid con 6.25uL de medio ADMEM **sin** SPF. Incubar 20 min a temperatura ambiente.
  - Par obtener una concentración de 150nM de iRNA preparar por pozo una mezcla de 0.127uL de iRNA 50nM mas 42.372uL de medio **sin** SBF.

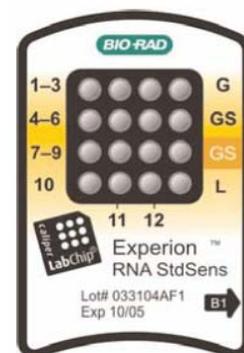
- 
- 
- Añadir el iRNA diluido al siPORT Lipid , mezclar cuidadosamente una vez con micropipeta. Incubar a temperatura ambiente por 20 min.
  3. Antes de la transfección remover el medio de cultivo y lavar las células con PBS 1X estéril. Agregar a cada pozo 200uL de medio ADMEM sin SBF.
  4. Añadir la mezcla de iRNA mas siPORT lipid a cada pozo. Distribuir gentilmente el complejo.
  5. Incubar 6 horas en condiciones de cultivo normales.
  6. Añadir de 250µl de medio con SBF a cada pozo para optimizar el crecimiento celular.
  7. Extraer el RNA total a las 24, 48 y 72 h post-transfección.

### 10.9 ANALISIS DE LA CALIDAD DEL RNA

1. Mezclar 65uL de gel filtrado con 1 uL de colorante (proteger la mezcla de la luz cubriendo el tubo con papel aluminio).
2. Colocar 9uL del gel teñido en la position GS PRIMING en un cartucho de BioRad para ser analizado con la plataforma EXPIRION.
3. Transferir el cartucho en un compresor para distribuir el gel.
4. Añadir 9 uL de gel teñido a la posición GS y 5uL de gel filtrado en la posición G.
5. Descargar 5 uL de buffer en los pozos en los que se colocaran las muestras o bien el marcador de peso molecular.
6. Desnaturalizar de 2 uL de cada muestra y 2 uL del marcador de peso molecular durante 2 min a 70° C y posteriormente colocarlas en hielo.
7. Agregar 1uL de muestra o marcador a su respectivo pozo.

**NOTA:** en cualquier paso **NO** formar burbujas

8. Colocar el chip en la estación de electroforesis de EXPIRION.
9. Analizar los electroferogramas.



---

---

## 10.10 MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN

### DIA I

#### PASO 1

1. Evaluar cantidad y pureza del RNA mediante el uso de nanodrop y la plataforma de expirion respectivamente.

#### SINTESIS DE LA PRIMER CADENA

2. Realizar una dilución serial del control de RNA poli-A, de la siguiente manera:

<b>1:20</b>	<b>1:50</b>	<b>1:50</b>	<b>1:10</b>
-------------	-------------	-------------	-------------

3. Preparar MIX 1 y MIX 2

#### MIX1

<b>Poli a (dilución final)</b>	2uL
<b>RNA (100ng)</b>	3uL

#### MIX2

<b>Buffer primer cadena</b>	4uL
<b>Enzima primer cadena</b>	1uL

4. Mezclar MIX 1 y MIX 2. Incubar 2 h a 42° C en un termociclador. Incubar en hielo hasta la síntesis de la segunda cadena

#### PASO 2

#### MIX3

<b>Agua libre de nucleasas</b>	13uL
<b>Buffer segunda cadena</b>	5uL
<b>Enzima segunda cadena</b>	2uL

5. Mezclar MIX 3 con MIX1 y MIX2. Volumen final= 30uL.
6. Incubar a 16° C 1 h y 10 min a 65° C, en un termociclador. Almacenar a -20° C o preferentemente realizar el marcaje con IVT inmediatamente.

---

---

**PASO 3****MIX 4**

<b>Sonda IVT Biotina</b>	4uL
<b>Buffer IVT</b>	20uL
<b>Enzima IVT</b>	6uL

7. Mezclar MIX 4 con los 30 uL de MIX 1,2,3. Incubar 16 h a 40° C.

**DIA II**

8. Calentar la solución de elución entre 50-60 ° C  
9. En una placa de 96 pozos preparar la siguiente mezcla:

<b>Perlas de unión a RNA</b>	10uL
<b>Buffer de unión concentrado aRNA</b>	50uL

10. Previamente agregar a un tubo eppendorf 60uL de RNA marcado. Mezclar por pipeteo y agregar a cada muestra 120 uL de Etanol al 100%. Transferir a cada pozo.
11. Mezclar con un shaker por 2 min.
- a. Colocar la placa sobre un magneto durante 5 min.
  - b. Aspirar y lavar las perlas con 100uL de solución de lavado.
  - c. Mezclar con shaker 1 min. Colocar la placa sobre el magneto. Remover el sobrenadante.
  - d. Repetir el lavado 1 vez.
12. Realizar la elución con 50 uL de la solución de elución calentada previamente a 50° - 60° C.
13. Mezclar en vortex durante 3 min.
14. Colocar la placa sobre el magneto 5 min y tranferir el sobrenadante a un tubo de 60 uL.

---

---

**NOTA:** la muestra puede ser almacenada a -20° C hasta por un año.

**DIA III**

**FRAGMENTACIÓN**

<b>aRNA</b>	15ug (1-32uL)
<b>Buffer de fragmentación 5X</b>	8uL
<b>Agua libre de nucleasas</b>	c.b.p. 40uL
<b>Volumen total</b>	40uL

15. Incubar 94° C durante 35 min e inmediatamente despues transferir a hielo o almacenar a -20° C.

**HIBRIDACIÓN**

16. Preparar la siguiente mezcla:

<b>aRNA marcado y fragmentado</b>	12.5ug (33.3uL)
<b>Control de oligonucleótido B2 (3nM)</b>	4.2uL
<b>Control de hibridación 20X</b>	12.5uL
<b>Mix de hibridación 2X</b>	125uL
<b>DMSO</b>	25uL
<b>Agua libre de nucleasas</b>	50uL
<b>Volumen final</b>	250uL

---

---

**NOTA:** es imperativo calentar a 65° C el control de hibridación 20 X antes de realizar la mezcla.

17. Calentar el coctel de hibridación durante 5 min a 99° C y 10 min a 45° C en una placa caliente.

**ACONDICIONAMIENTO DEL CHIP**

18. Colocar en el chip 200uL del coctel de pre-hibridación e incubar a 45° C durante 10 min con rotación.

19. Remover la mezcla de pre-hibridación.

20. Colocar en el chip la mezcla preparada en el paso 16. Incubar a 45° C durante 16 h con rotación a 60 rpm.

---

---

## CAPITULO XI

### BIBLIOGRAFÍA

1. Lürmann, A. Eine Icterusepidemie. Berl. Klin. Wochenschr. 1885. 22: 20-23.
2. Hsiung D. Progress in clinical virology--1960 to 1980: a recollection of twenty years. Yale J Biol Med. 1980; 53(1): 1-4.
3. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH: Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. Science 182:1026-1028, 1973.
4. Houghton M, Weiner A, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C virus: implications for diagnosis, development and control of viral disease. Hepatology 1991; 14:381-388.
5. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome". Science 1989, 244 (4902): 359-62..
6. Kuo G, Choo QL, Alter HJ. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. Science 1989, 244 (4902): 362-4.
7. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (CV) infection. Int J Med Sci. 2006;3(2):41-6.
8. Carr BI. Hepatocelular carcinoma: current management and future trends. Gastroenterology. 2004. Nov; 127(5 suppl): S218-24.
9. Stéphane Chevaliez; Jean-Michel Pawlotsky. Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. Annals of Hepatology 2009; 8(1): January-March: 7-12
10. Theodore Sy and M. Mazen Jamal. Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. Int J Med Sci. 2006; 3(2): 41-46.
11. Perez CM, Suarez E, Torres EA, Roman K, Colon V. Seroprevalence of hepatitis C virus and associated risk behaviours: a population-based study in San Juan, Puerto Rico. Int J Epidemiol. 2005;34(3):593-9.
12. Munoz G, Velasco M, Thiers V, Hurtado C, Brahm J, Larrondo-Lillo M, Guglielmetti A, Smok G, Brechot C, Lamas E. Prevalence and genotypes of hepatitis C virus in

---

---

blood donors and in patients with chronic liver disease and hepatocarcinoma in a Chilean population. *Rev Med Chil.* 1998;126(9):1035–42.

**13** Touzet S, Kraemer L, Colin C, Pradat P, Lanoir D, Bailly F, Coppola RC, Sauleda S, Thursz MR, Tillmann H, Alberti A, Braconier JH, Esteban JI, Hadziyannis SJ, Manns MP, Saracco G, Thomas HC, Trepo C. Epidemiology of hepatitis C virus infection in seven European Union countries: a critical analysis of the literature. HENCORE Group (Hepatitis C European Network for Cooperative Research) *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000;12:667–678.

**14.** Mohsen A, Group T. H. The epidemiology of hepatitis C in a UK health regional population of 5.12 million. *Gut.* 2001 May; 48(5): 707–713.

**15.** Bellentani S, Tiribelli C. The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *J Hepatol.* 2001;35:531–7.

**16.** Stroffolini T, Menchinelli M, Dambruoso V, Menniti Ippolito F, Costantino A, Rapicetta M, Lecce R, Taliani G. High prevalence of hepatitis C virus infection in a small central Italian town: lack of evidence of parenteral exposure. *Ital J Gastroenterol.* 1995;27:235–8.

**17.** Raffaele A, Valenti M, Iovenitti M, Matani A, Bruno ML, Altobelli E, D'Alessandro A, Barnabei R, Leonardis B, Taglieri G. High prevalence of HCV infection among the general population in a rural area of central Italy. *Eur J Epidemiol.* 2001;17:41–6.

**18.** Maio G, d'Argenio P, Stroffolini T, Bozza A, Sacco L, Tosti ME, Intorcchia M, Fossi E, d'Alessio G, Kondili LA, Rapicetta M, Mele A. Hepatitis C virus infection and alanine transaminase levels in the general population: a survey in southern Italian town. *J Hepatol.* 2000;33:116–20.

**19.** Pradat P. Prevalence of hepatitis C infection among general practice patients in the Lyon area, France. *Eur J Epidemiol.* 2001;17(1):47–51.

**20.** Ogarkov PI, Malyshev VV, Tokmakov VS, Smirnov AV. Epidemiological features of virus hepatitis in the Russian army. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2004;50:165–9.

**21.** Barna TK, Ozsvar Z, Szendrenyi V, Gal G. Hepatitis C virus antibody in the serum of blood donors. *Orvosi Hetilap.* 1996;137:507–511.

**22.** Saeed AA, al-Admawi AM, al-Rasheed A, Fairclough D, Bacchus R, Ring C, Garson J. Hepatitis C virus in Egyptian blood donors in Riyadh. *Lancet.* 1991;33:359–60.

- 
- 
- 23.** Darwish NM. Hepatitis C virus infection in blood donors in Egypt. *J Egypt Public Health Assoc.* 1992;67(3-4):223–36.
  - 24.** Bassily S, Hyams KC, Fouad RA, Samaan MD, Hibbs RG. A high risk of hepatitis C infection among Egyptian blood donors: the role of parenteral drug abuse. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(6):503–5.
  - 25.** Darwish MA, Raouf TA, Rushdy P, Constantine NT, Rao MR, Edelman R. Risk factors associated with a high seroprevalence of hepatitis C virus infection in Egyptian blood donors. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49(4):440–7.
  - 26.** Al-Faleh FZ, Ramia S, Arif M, Ayoola EA, al-Rashed RS, al-Jeffry M, Hossain A, el-Hazmi M. Profile of hepatitis C virus and the possible modes of transmission of the virus in the Gizan area of Saudi Arabia: a community-based study. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995;89:431–437.
  - 27.** El Guneid AM, Gunaid AA, O'Neill AM, Zureikat NI, Coleman JC, Murray-Lyon IM. Prevalence of hepatitis B, C and D virus markers in Yemeni patients with chronic liver disease. *J Med Virol.* 1993;40:330–333.
  - 28.** Tanaka J, Kumagai J, Katayama K, Komiya Y, Mizui M, Yamanaka R, Suzuki K, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Sex- and age-specific carriers of hepatitis B and C viruses in Japan estimated by the prevalence in the 3,485,748 first-time blood donors during 1995-2000. *Intervirology.* 2004;47(1):32–40.
  - 29.** Wang Y, Tao QM, Zhao HY, Tsuda F, Nagayama R, Yamamoto K, Tanaka T, Tokita H, Okamoto H, Miyakawa Y. Hepatitis C virus RNA and antibodies among blood donors in Beijing. *J Hepatol.* 1994;21:634–640.
  - 30.** Zhang YY, Hansson BG, Widell A, Nordenfelt E. Hepatitis C virus antibodies and hepatitis C virus RNA in Chinese blood donors determined by ELISA, recombinant immunoblot assay and polymerase chain reaction. *APMIS.* 1992;100:851–855.
  - 31.** Amin J, Gidding H, Gilbert G, Backhouse J, Kaldor J, Dore G, Burgess M. Hepatitis C prevalence - a nationwide serosurvey. *Commun Dis Intell.* 2004;28(4):517–21.
  - 32.** Frommel D, Tekle-Haimanot R, Berhe N, Aussel L, Verdier M, Preux PM, Denis F. A survey of antibodies to hepatitis C virus in Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:435–439.

- 
- 
33. Ilako FM, McLigeyo SO, Riyat MS, Lule GN, Okoth FA, Kaptich D. The prevalence of hepatitis C virus antibodies in renal patients, blood donors and patients with chronic liver disease in Kenya. *East Afr Med J*. 1995;72:362–364.
  34. Gómez-Hernández G, Reyes-Islas E, Abdo-Francis JM, Chávez-Mayol JM. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de hepatitis C en donadores de sangre del Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2010; 73 (2).
  35. <http://www.insp.mx/>
  36. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/sem51/pdf/cua10.pdf>
  37. Akari H, Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S. Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. *Microbiol Immunol*. 2009 Jan;53(1):53-7.
  38. Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB. Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *J Virol* 2001;75:1229-35
  39. Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2008 Jul 21;14(27):4300-8.
  40. Shepard CW, Finelli L and Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-67.
  41. Newell ML, Pembrey L. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *Drugs Today (Barc)*. 2002 May;38(5):321-37.
  42. Tohme RA, Holmberg SD. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? *Hepatology*. 2010 Oct;52(4):1497-505.
  43. Yeung KS, Meanwell NA, Qiu Z. Structure-activity relationship studies of a bisbenzimidazole-based, Zn(2+)-dependent inhibitor of HCV NS3 serine protease. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:2355-9
  44. Tedaldi EM, Hullsiek KH, Malvestutto CD. Prevalence and characteristics of hepatitis C virus coinfection in a human immunodeficiency virus clinical trials group: the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *Clin Infect Dis* 2003;36:1313-7.
  45. Yen T, Keeffe EB, Ahmed A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36(1): 47-53.

- 
- 
46. Bernstein D. Diagnosis and management of hepatitis C. *Gastroenterology Clinic Medscape* 2001: 1-29.
  47. Albeldawi M, Ruiz-Rodriguez E, Carey WD. Hepatitis C virus: Prevention, screening, and interpretation of assays. *Cleve Clin J Med.* 2010;77(9):616-26.
  48. Schreuder I, van der Sande MA, de Wit M, Bongaerts M, Boucher CA, Croes EA, van Veen MG. Seroprevalence of HIV, hepatitis b, and hepatitis c among opioid drug users on methadone treatment in the netherlands. *Harm Reduct J.* 2010 Oct 26;7:25.
  49. Liliana Gazzuola Rocca, Barbara P. Yawn, Peter Wollan, and W. Ray Kim. Management of Patients With Hepatitis C in a Community Population: Diagnosis, Discussions, and Decisions to Treat. *Ann Fam Med.* 2004 March; 2(2): 116–124.
  50. Naama Klopstock, Mark Katzenellenbogen, Orit Pappo, Miriam Sklair-Levy, Devorah Olam, Lina Mizrahi, Tamara Potikha, Eithan Galun, and Daniel Goldenberg. HCV Tumor Promoting Effect Is Dependent on Host Genetic Background. *PLoS ONE.* 2009; 4(4): e5025.
  51. Wilkins T, Malcolm JK, Raina D, Schade RR. Hepatitis C: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2010 Jun 1;81(11):1351-7.
  52. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345(1):41-52.
  53. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):17-35.
  54. Alves de Mattos A, Zambam de Mattos A. Treatment of HCV infection in patients with cirrhosis. *Ann Hepatol.* 2010;9 Suppl:80-3.
  53. Pérez Roldán F, De Diego A, Casado M, Matilla A, Bañares R, García-Durán F, Salcedo M, Cos E, Clemente G. Treatment with interferon alfa-2b in patients with chronic hepatitis caused by hepatitis C virus: predictive factors for the response, relapse and early development to cirrhosis after treatment. *Rev Esp Enferm Dig.* 1996 Sep;88(9):609-15.
  54. Omland LH, Farkas DK, Jepsen P, Obel N, Pedersen L. Hepatitis C virus infection and risk of cancer: a population-based cohort study. *Clin Epidemiol.* 2010 Aug 9;2:179-86.
  55. Patel JH, Cobbold JF, Thomas HC, Taylor-Robinson SD. Hepatitis C and hepatic steatosis. *QJM.* 2010 May;103(5):293-303.

- 
- 
- 56.** Geerts A. History heterogeneity developmental biology and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liv Dis* 2001;21:311-335.
- 57.** Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteases and their Inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol, Gastrointes Liver Physiol* 2000;279:G245-G249.
- 59.** Lijnen HR, Begona A, Berthe VH, Desiré C & Paul GD. Inactivation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 by specific proteolysis with stromelysin-1 (MMP-3). *JBC* 2000;275:37645-37650.
- 58** Kondou H, Mushiake S, Etani Y, Moyoshi Y, Michigami T, Ozono K. A blocking peptide for transforming growth factor-B1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. *J Hepatol* 2003;39:742-748.
- 60.** Bataller R, Brenner DA. Fiver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-18.
- 61.** Oiaso E, Friedman S. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998; 29: 836-47.
- 62.** Fotersztain S, Julien B, Teix-CiercC F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanism and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 605-28.
- 63.** Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 3-15.
- 64.** Lee MH, Yang HI, Lu SN, Jen CL, Yeh SH, Liu CJ, Chen PJ, You SL, Wang LY, Chen WJ, Chen CJ. Hepatitis C virus seromarkers and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: long-term predictors from a community-based cohort study. *J Clin Oncol.* 2010 Oct 20;28(30):4587-93.
- 65.** Zechini B, Pasquazzi C, Aceti A. Correlation of serum aminotransferases with HCV RNA levels and histological findings in patients with chronic hepatitis C: the role of serum aspartate transaminase in the evaluation of disease progression. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004 Sep;16(9):891-6.
- 66.** Nadeem A, Hussain MM, Aslam M. Correlation of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels to liver histology in chronic hepatitis C. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2010 Oct;20(10):657-61.

- 
- 
- 67.** Bodlaj G, Hubmann R, Saleh K, Stojakovic T, Biesenbach G, Berg J. Alkaline phosphatase predicts relapse in chronic hepatitis C patients with end-of-treatment response. *World J Gastroenterol.* 2010 May 21;16(19):2407-10.
- 68.** Koziel M. Immunology of viral hepatitis. *Am J Med* 1996; 100:98-109.
- 69.** Yoshihara N. ELISA for diagnosis of infections by viruses. *Nippon Rinsho* 1995; 53: 2277-82.
- 70.** Gretch DR. Diagnostic test for hepatitis C. *Hepatology*, 1997; 263 (Suppl) 43S-47S.
- 71.** isabelle desombere, hans van vlierberghe, sibyl couvent, filip clinckspoor, and geert leroux-roels. comparison of qualitative (cobas amplicor hcv 2.0 versus versant hcv rna) and quantitative (cobas amplicor hcv monitor 2.0 versus versant hcv rna 3.0) assays for hepatitis c virus (hcv) rna detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of hcv infections. *j clin microbiol.* 2005 june; 43(6): 2590–2597.
- 72.** Córdoba J, Olaso V, Molina JM, López B, Argüello L, Ortiz V, et al. Análisis comparativo de la carga viral mediante bDNA HCV RNA-2.0 y Amplicor HCV Monitor, en pacientes infectados por el virus de la hepatitis C. *Enf Infec Microbiol* 2000; 18: 6-11.
- 73.** Abstracts of 33<sup>rd</sup> Annual Conference of ISBTI: 33<sup>rd</sup> ISBTI National Conference 5–7<sup>th</sup> December 2008, SGPGI, Lucknowsian *J Transfus Sci.* 2009 January; 3(1): 28–56.
- 74.** Kanno A, Kazuyama Y. Immunoglobulin G antibody avidity assay for serodiagnosis of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2002;68(2):229-33.
- 75.** Sansonno D, Lauletta G, De Re V, Tucci FA, Gatti P, Racanelli V, et al. Intrahepatic B cell clonal expansions and extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 2004;34(1):126-36.
- 76.** Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:391-424.
- 77.** Alatrakchi N, Di Martino V, Thibault V, Autran B. Strong CD4 Th1 responses to HIV and hepatitis C virus in HIV-infected long-term non-progressors co-infected with hepatitis C virus. *Aids* 2002;16(5):713-7.
- 78** Pârvu AE, Negrean V, Pleșca-Manea L, Cosma A, Drăghici A, Uifălean A, Moldovan R. Nitric oxide in patients with chronic liver diseases. *Rom J Gastroenterol.* 2005 Sep;14(3):225-30.

- 
- 
- 79.** Han YD, Hong YK, Kang JG, Choi YJ, Park CH. Relation of the expression of cyclooxygenase-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas to angiogenesis and prognosis. *J Korean Soc Coloproctology*. 2010 Oct;26(5):339-46.
- 80.** Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 1991;12(10):349-52.
- 81.** Choi Y, Lee MK, Lim SY, Sung SH, Kim YC. Inhibition of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and interleukin-1beta by torilin is mediated by mitogen-activated protein kinases in microglial BV2 cells. *Br J Pharmacol*. 2009 Mar;156(6):933-40.
- 82.** Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 2000;275(31):23627-35.
- 83.** Hyman A, Yim C, Krajden M, Read S, Basinski AS, Wanless I, et al. Oral prostaglandin (PGE2) therapy for chronic viral hepatitis B and C. *J Viral Hepat* 1999;6(4):329-36.
- 84.** Symensma TL, Martinez-Guzman D, Jia Q, Bortz E, Wu TT, Rudra-Ganguly N. COX-2 induction during murine gammaherpesvirus 68 infection leads to enhancement of viral gene expression. *J Virol* 2003;77(23):12753-63.
- 85.** Zhu H, Cong JP, Yu D, Bresnahan WA, Shenk TE. Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):3932-7.
- 86.** Kamal SM, Amin A, Madwar M, Graham CS, He Q, Al Tawil A, et al. Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients. *J Virol* 2004;78(22):12252-8.
- 87.** Lancaster T, Sanders E, Christie JM, Brooks C, Green S, Rosenberg WM. Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2002;9(1):18-28.
- 88.** Sepiashvili RI, Balmasova IP, Kabanova EV, Malova ES, Pleskanovskaia EV. Hepatitis C virus: biology, immunopathogenesis, and NK/NKT cells during viral persistence]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2006 Nov-Dec;(7):109-16.
- 89.** Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005;23:307-36.

- 
- 
- 90.** Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antivir Ther* 2005;10
  - 91.** Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel-Fabiani F. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol*. 2007 May 7;13(17):2416-26.
  - 92.** Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42: 962-973.
  - 93.** Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 1994; 75: 1053-1061.
  - 94.** Halfon P, Roubicek C, Gerolami V, Quentin Y, Khiri H. Use of phylogenetic analysis of hepatitis C virus (HCV) hypervariable region 1 sequences to trace an outbreak of HCV in an autodialysis unit. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (4): 1541-1545.
  - 95.** Bukh J, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin liver Dis*. 1995, Feb; 15(1):41-63.
  - 96.** Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* 2001; 82: 693-712.
  - 97.** Fretz C, Jeannel D, Stuyver L, Herve V, Lunel F, Boudifa A, Mathiot C, de The G, Fournel JJ. HCV infection in a rural population of the Central African Republic (CAR): evidence for three additional subtypes of genotype 4. *J Med Virol* 1995; 47: 435-437.
  - 98.** Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: S97-S101.
  - 99.** Zein N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Rev Clin Microbiol* 2000; 13 (2): 223-235.
  - 100.** Jeannel D, Fretz C, Traore Y, Kohdjo N, Bigot A, Pe Gamy E, Jourdan G, Kourouma K, Maertens G, Fumoux F, Fournel JJ, Stuyver L. Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. *J Med Virol* 1998; **55**: 92-97.

- 
- 
- 101.** Rivas-Estilla AM, Cordero-Pérez P, Trujillo-Murillo Kdel C, Ramos-Jiménez J, Chen-López C, Garza-Rodríguez Mde L, Ramírez-Gutiérrez A, Muñoz-Espinosa L. Genotyping of hepatitis C virus (HCV) in infected patients from Northeast Mexico. *Ann Hepatol.* 2008 Apr-Jun;7(2):144-7.
- 102.** Panduro A, Roman S, Khan A, Tanaka Y, Kurbanov F, Martinez-Lopez E, Campollo O, Hernandez-Nazara Z, Mizokami M. Molecular epidemiology of hepatitis C virus genotypes in west Mexico. *Virus Res.* 2010 Jul;151(1):19-25.
- 103.** Jimenez-Mendez R, Uribe-Salas F, López-Guillen P, Cisneros-Garza L, Castañeda-Hernandez G. Distribution of HCV genotypes and HCV RNA viral load in different regions of Mexico. *Ann Hepatol.* 2010 Jan-Mar;9(1):33-9.
- 104.** Márquez-Rosales M, Santoscoy-Tovar F, Montoya-Fuentes H. Frecuencia y distribución de genotipos del virus de la hepatitis C en población mexicana seleccionada. *Rev Mex Patol Clin*, Vol. 55, Núm. 2, 2008, pp 79-87.
- 105.** Bain C, Inchauspe G. Dendritic cells and hepatitis C virus. *Pathol Biol* 2001;49:464-5
- 106.** Sung VM, Shimodaira S, Doughty AL. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol* 2003;77:2134-46.
- 107.** Napolitano M, Giuliani A, Alonzi T, Mancone C, D'Offizi G, Tripodi M, Bravo E. Very low density lipoprotein and low density lipoprotein isolated from patients with hepatitis C infection induce altered cellular lipid metabolism. *J Med Virol.* 2007 Mar;79(3):254-8.
- 108.** Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-41.
- 109.** Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol*, 2001;2:693-712.
- 110** Scarselli E, Ansuini H, Cerino R. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 2002;21:5017-25.
- 111.** Lozach PY, Amara A, Bartosch B. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 2004;279:32035-45.

---

---

**112.** Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol*, 2001;313(3):451-64.

f. Hsu M, Zhang J, Flint M. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7271-6.

**113.** Romero-López C, Berzal-Herranz A. A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA*. 2009 Sep;15(9):1740-52.

**114.** Dahari H, Ribeiro RM, Rice CM, Perelson AS. Mathematical modeling of subgenomic hepatitis C virus replication in Huh-7 cells. *J Virol*. 2007 Jan;81(2):750-60.

**115.** Zeisel MB, Fofana I, Fafi-Kremer S, Baumert TF. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: Molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *J Hepatol*. 2010 Nov 11.

**116.** Budkowska A. Mechanism of cell infection with hepatitis C virus (HCV)--a new paradigm in virus-cell interaction. *Pol J Microbiol*. 2009;58 (2):93-8.

**117.** Merz A, Long G, Hiet MS, Bruegger B, Chlanda P, Andre P, Wieland F, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J Biol Chem*. 2010.

**118.** Tong Y, Zhu Y, Liu Y, Feng Y, Hua X, Chen Z, Ding H, Gao L, Wang Y, Feitelson MA, Xia X, Zhao P, Qi Z. Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2010 Dec 22.

**120.** Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2002. Nov; 36 (5 Suppl): S121-7.

**121.** Sozzani S, Bosisio D, Scarsi M, Tincani A. Type I interferons in systemic autoimmunity. *Autoimmunity*. 2010 Apr;43 (3):196-203.

**122.** Charles S. Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews*. Oct, 2001: 778-809.

**123.** Hoofnagle H, Seeff L. Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *The new england journal of medicine*. 2006. 355: 2444-51.

**124.** Wilkins T, Malcolm JK, Raina D, Schade RR. Hepatitis C: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2010 Jun 1;81(11):1351-7.

**125.** Chen CH, Yu ML. Evolution of interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hepat Res Treat*. 2010;2010:140953.

- 
- 
- 126.** Aghemo A, Rumi MG, Colombo M. Pegylated interferons alpha2a and alpha2b in the treatment of chronic hepatitis C. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Sep;7(9):485-94.
- 127.** Huang JF, Yu ML, Huang CF, Chiu CF, Dai CY, Huang CI, Yeh ML, Yang JF, Hsieh MY, Hou NJ, Lin ZY, Chen SC, Wang LY, Chuang WL. The efficacy and safety of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in chronic hepatitis c patients with hepatocellular carcinoma post curative therapies - A multicenter prospective trial. *J Hepatol.* 2010.
- 128.** Kleter GE, Brouwer JT, Heijtkink RA, Schalm SW, Quint WG. Detection of hepatitis C virus RNA in patients with chronic hepatitis C virus infections during and after therapy with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Mar;37(3):595-7.
- 129.** Zeuzem S, Poordad F. Pegylated-interferon plus ribavirin therapy in the treatment of CHC: individualization of treatment duration according to on-treatment virologic response. *Curr Med Res Opin.* 2010 Jul;26 (7):1733-43.
- 130.** Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J. Evaluation of the safety and efficacy of once-weekly PEG/interferon alfa 2A (Pegasys) for chronic hepatitis C. A multinational, randomized study. *J Hepatol* 2000; 32 Suppl 2:29.
- 130.** Foster GR. Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C: pharmacological and clinical differences between peginterferon-alpha-2a and peginterferon-alpha-2b. *Drugs.* 2010;70 (2):147-65.
- 131.** Takehara T. Antiviral therapy for chronic hepatitis C: current status and perspectives]. *Yakugaku Zasshi.* 2010 Feb;130 (2):143-56.
- 132.** McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER. Interferon Alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 1998;339:1485-1492.
- 133.** Neyts, J. Selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antivir. Res.* 2006. 71:363-371.
- 134.** Asselah T. NS5A inhibitors: a new breakthrough for the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2010 Dec 15.

- 
- 
- 135.** Hézode Ch, Forestier N, Dusheiko D, Ferenci P, Pol S, Goeser T et al Telaprevir and Peginterferon with or without Ribavirin for Chronic HCV Infection. *N. Engl J Med* 2009; 360:1839-1850.
- 136.** Kwo PY, Lawitz E, McCone J. Response-Guided Therapy (RGT) for Boceprevir (Boc) Combination Treatment? - Results from HCV SPRINT-1. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2009). Boston. October 30-November 1, 2009. Abstract 1582
- 137.** Forestier N, Larrey D, Guyader D, Marcellin P, Rouzier R, Patat A, Smith P, Bradford W, Porter S, Blatt L, Seiwert SD, Zeuzem S. Treatment of Chronic Hepatitis C Patients with the NS3/4A Protease Inhibitor Danoprevir (ITMN-191/RG7227) Leads to Robust Reductions in Viral RNA: A Phase 1b Multiple Ascending Dose Study. *J Hepatol.* 2010 Dec 8.
- 138.** Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, Serrano-Wu MH, Langley DR, Sun JH, O'Boyle DR 2nd, Lemm JA, Wang C, Knipe JO, Chien C, Colonno RJ, Grasela DM, Meanwell NA, Hamann LG. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature.* 2010 May 6;465(7294):96-100.
- 139.** Beaulieu PL. Non-nucleoside inhibitors of the HCV NS5B polymerase: progress in the discovery and development of novel agents for the treatment of HCV infections. *Curr Opin Investig Drugs.* 2007 Aug;8(8):614-34.
- 140.** Vermehren J, Sarrazin C. New HCV Therapies on the Horizon. *Clin Microbiol Infect.* 2010 .
- 141.** Mo H, Lu L, Pilot-Matias T, Pithawalla R, Mondal R, Masse S, Dekhtyar T, Ng T, Koev G, Stoll V, Stewart KD, Pratt J, Donner P, Rockway T, Maring C, Molla A. Mutations conferring resistance to a hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase inhibitor alone or in combination with an HCV serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Oct;49(10):4305-14.
- 142.** McHutchison JG, Shiffman M, Terrault N. A Phase 2B study of telaprevir with peginterferon- $\alpha$ -2a and ribavirin in hepatitis C genotype 1 null and partial responders and relapsers following a prior course of PEG-interferon- $\alpha$ -2a/b and ribavirin therapy: PROVE-3 interim results. *Hepatology* 2008 48, 431-432.

- 
- 
- 143.** Kwo PY, Lawitz E, McCone J. High Sustained Virologic Response (SVR) in Genotype 1 (G1) Null Responders to Peg-Interferon alfa-2b (P) plus Ribavirin (R) When Treated with Boceprevir (Boc) Combination Therapy. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2009). Boston. October 30-November 1, 2009. Abstract 62.
- 144.** Gane EJ, Roberts SK, Stedman CA, Angus PW, Ritchie B, Elston R, Ipe D, Morcos PN, Baher L, Najera I, Chu T, Lopatin U, Berrey MM, Bradford W, Laughlin M, Shulman NS, Smith PF. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet*. 2010 Oct 30;376(9751):1467-75.
- 145.** White PW, Llinàs-Brunet M, Amad M, Bethell RC, Bolger G, Cordingley MG, Duan J, Garneau M, Lagacé L, Thibeault D, Kukolj G. Preclinical characterization of BI 201335, a C-terminal carboxylic acid inhibitor of the hepatitis C virus NS3-NS4A protease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4611-8.
- 146.** Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*. 2004;63:71-180.
- 147.** Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jun;5(6):453-63. Epub 2007 May 8.
- 148.** Lohmann V, Körner F, Koch JO, Herian U, Theilmann L. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999;285:110-113.
- 149.** Foster TL, Belyaeva T, Stonehouse NJ, Pearson AR, Harris M. All three domains of the hepatitis C virus nonstructural NS5A protein contribute to RNA binding. *J Virol*. 2010 Sep;84(18):9267-77.
- 150.** Appel N, Schaller T, Penin F, Bartenschlager R. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J Biol Chem*. 2006;281:9833-9836.
- 151.** Li ZH, Tang QB, Wang J, Zhou L, Huang WL, Liu RY, Chen RF. Hepatitis C virus core protein induces malignant transformation of biliary epithelial cells by activating nuclear factor-kappaB pathway. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Jul;25(7):1315-20.

- 
- 
- 152.** Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol*. 2010 Sep;84(18):9118-27.
- 153.** Dubuisson J, Penin F, Moradpour D. Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 517-523.
- 154.** Goffard A, Dubuisson J. Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* 2003; 85: 295-301.
- 155.** Callens N, Ciczora Y, Bartosch B, Vu-Dac N, Cosset FL, Pawlotsky JM, Penin F, Dubuisson J. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* 2005; 79: 15331- 15341.
- 156.** Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM. Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* 1994; 68: 5063-5073.
- 157.** Bartosch B, Cosset FL. Cell entry of hepatitis C virus. *Virology* 2006; 348: 1-12
- 158.** Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-941.
- 159.** Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, Penin F, Dubuisson J. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* 2000; 74: 3623-3633.
- 160.** Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21: 5017-5025.
- 161.** Cocquerel L, Op de Beeck A, Lambot M, Roussel J, Delgrange D, Pillez A, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* 2002; 21: 2893-2902.
- 162.** Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol*. 2007 May 7;13(17):2406-15.
- 163.** Reed KE, Rice CM. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 242: 55-84.

- 
- 
- 164.** Jones CT, Murray CL, Eastman DK, Tassello J, Rice CM. Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol.* 2007;81:8374–8383.
- 165.** Jirasko V, Montserret R, Appel N, Janvier A, Eustachi L. Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem.* 2008;283:28546–28562.
- 166.** Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW, Adachi T, Hostomska Z. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 1996; 87: 331-342.
- 167.** Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1994; 68: 3631-3641.
- 168.** Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *J Biol Chem.* 2010 Jul 23;285(30):22725-31. Epub 2010 May 10.
- 169.** Phan T, Kohlway A, Dimberu P, Pyle AM, Lindenbach BD. The Acidic Domain of Hepatitis C Virus NS4A Contributes to RNA Replication and Virus Particle Assembly. *J Virol.* 2010 Nov 3.
- 170.** Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 2003; 77: 5428-5438.
- 171.** Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2004; 279: 40835-40843.
- 172.** Huang L, Hwang J, Sharma SD, Hargittai MR, Chen Y, Arnold JJ, Raney KD, Cameron CE. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 36417-36428.
- 173.** Shimakami T, Hijikata M, Luo H, Ma YY, Kaneko S, Shimotohno K, Murakami S. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 2004; 78: 2738-2748.
- 174.** Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology* 2001; 284: 1-12.

- 
- 
- 175.** Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, Jacobsen H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol.* 1994 Aug;68(8):5045-55.
- 176.** Bung C, Bochkaeva Z, Terenin I, Zinovkin R, Shatsky IN, Niepmann M. Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett.* 2010 Feb 19;584(4):837-42. Epub 2010 Jan 16.
- 178.** Romero-López C, Berzal-Herranz A. A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA.* 2009 Sep;15(9):1740-52. Epub 2009 Jul 15.
- 179.** Francois P, Dubuisson J, Felix R, Moradpour D, Pawlostky. Estructural biology of hepatitis C Virus. *Hepatology* 2004; 39:5-19.
- 180.** Dubuisson. J Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* (2007) 13:2406-2415.
- 181.** Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999 Jul 2;285(5424):110-3.
- 182.** Bartenschlager R, Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 2001 Oct;52(1):1-17.
- a hepatoma cell line. *Science.* 1999 Jul 2;285(5424):110-3.
- 183.** Bartenschlager R. Hepatitis C Virus replicons: potential role for drug development. *Nature.* 2002: vol 1; 911-916.
- 184.** Gosert R, Bienz K. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J virology.* 2003 May: 77(9): 5487-92.
- 185.** Blight, K. J., J. A. McKeating, and C. M. Rice. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 76:13001-13014.
- 186.** He Y, Yan W, Coito C, Li Y, Gale M Jr, Katze MG. The regulation of hepatitis C virus (HCV) internal ribosome-entry site-mediated translation by HCV replicons and nonstructural proteins. *J Gen Virol.* 2003 Mar;84(Pt 3):535-43.
- 187.** Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res.* 2003 Jun 15;110(5-6):255-8.
- 188.** Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-82.

- 
- 
- 189.** Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. Cyclooxygenase and prostaglandin synthases: roles in plaque stability and instability in humans. *Curr Opin Lipidol*. 2009 Oct;20(5):402-8.
- 190.** Gulam Waris and Aleem Siddiqui. Hepatitis C Virus Stimulates the Expression of Cyclooxygenase-2 via Oxidative Stress: Role of Prostaglandin E<sub>2</sub> in RNA Replication. *J Virol*. 2005 August; 79(15): 9725–9734.
- 191.
- 191.** Myungsoo Joo, Young S. Hahn, Minjae Kwon, Ruxana T. Sadikot, Timothy S. Blackwell, and John W. Christman. Hepatitis C Virus Core Protein Suppresses NF-κB Activation and Cyclooxygenase-2 Expression by Direct Interaction with IκB Kinase β. *J Virol*. 2005 June; 79(12): 7648–7657.
- 192.** Pham SV, Pham PC, Pham PM, Miller JM, Pham PT, Pham PA. Antithrombotic strategies in patients undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndrome. *Drug Des Devel Ther*. 2010 Sep 7;4:203-20.
- 193.** Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Nov;57 Suppl 5:113-24.
- 194.** Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep*. 2010 Mar-Apr;62(2):233-44.
- 195.** Trujillo-Murillo K, Rivas-Estilla AM. Acetylsalicylic Acid Inhibits Hepatitis C Virus RNA and Protein Expression Through Cyclooxygenase 2 Signaling Pathways. *Hepatology*; 2008.
- 196.** Gilroy D. New insights into the anti-inflammatory actions of aspirin-induction of nitric oxide through the generation of epi-lipoxins. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2005: 49-54.
- 197.** Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. Macrophage endothelial nitric oxide synthase auto-regulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. 2003. *J Biol Chem* 9: 9.
- 198.** Tesei A, Zoli W, Fabbri F, Leonetti C, Rosetti M, Bolla M, Amadori D, Silvestrini R. NCX 4040, an NO-donating acetylsalicylic acid derivative: efficacy and mechanisms of action in cancer cells. *Nitric Oxide*. 2008 Sep;19(2):225-36. Epub 2008 Apr 22.

- 
- 
- 199.** Gresele P, Momi S. Pharmacologic profile and therapeutic potential of NCX 4016, a nitric oxide-releasing aspirin, for cardiovascular disorders. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006; 24 (2): 148-168.
- 200.** Di Napoli M, Papa F. NCX-4016 NicOx. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003;4:1126-39.
- 201.** Wallace JL, Muscara MN, McKnight W, Dickey M, Del Soldato P, Cirino G. In vivo antithrombotic effect of a nitric oxide-releasing aspirin derivative, NCX-4016. *Thromb Research.* 1999;93: 43-50.
- 202.** Kuwahara H, Miyamoto Y, Akaike T, Kubota T, Sawa T, Okamoto S, Maeda H. Helicobacter pylori urease suppresses bactericidal activity of peroxy nitrite via carbon dioxide production. *Infect Immun* 2000; 68:4378-83.
- 203.** Akaike T, Maeda H. Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 2000. 101: 300-308.
- 204.** James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev* 1995; 59:533-47.
- 205.** Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, Maeda H. Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their role in the antimicrobial mechanism against Salmonella typhimurium in mice. *Infect Immun* 1997; 65:2932-40.
- 206.** Morris SM Jr (2004) Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 134:2743S–2747S discussion 2765S-2767S.
- 207.** Griffith, O. W., and D. J. Stuehr. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol* 1995.. 57:707–736.
- 208.** Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245–313.
- 210.** MacMicking, J. D., Q.-W. Xie, and C. Nathan. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol* 1997.15:323–350.
- 211.** Pacher P, Beckman J, Llaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2007 January ; 87(1): 315–424.
- 212.** Lang KS. Host mechanisms in viral hepatitis. *Dig Dis.* 2010;28(1):25-30.
- 213.** Thiemeermann C: The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock. *Advances in Pharmacology* 28:45-79, 1994.

- 
- 
- 214.** Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* 2010 May;459(6):923-39.
- 215.** O'Connor DM, O'Brien T. Nitric oxide synthase gene therapy: progress and prospects. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Jul;9(7):867-78.
- 216.** Kleinert H, Schwarz PM, Förstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem.* 2003 Oct-Nov;384(10-11):1343-64.
- 217.** Croen K. Evidence for an antiviral effect of nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 1993: 2446-2452.
- 218.** Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2010 Sep 15;23(2):75-93.
- 219.** Gao Y. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch.* 2010 May;459(6):829-39.
- 220.** Park H, Choi E-J. Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase by means of S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 December 19; 97(26): 14382–14387.
- 221.** Yang CS, Yuk JM, Jo EK. The role of nitric oxide in mycobacterial infections. *Immune Netw.* 2009 Apr;9(2):46-52.
- 222.** Olin MR, Armien AG, Cheeran MC, Rock RB, Molitor TW, Peterson PK. Role of nitric oxide in defense of the central nervous system against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 2008 Sep 15;198(6):886-9.
- 223.** Calegari-Silva TC, Pereira RM, De-Melo LD, Saraiva EM, Soares DC, Bellio M, Lopes UG. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett.* 2009 Dec 2;127(1):19-26.
- 224.** Chen F, Demers M. Nitric oxide inhibits HIV tat-induced NF-kB activation. *American Journal of Pathology.* Vol. 155, No. 1, July 1999: 275-284.
- 225.** Cairoli E, Scott-Algara D, Pritsch O, Dighiero G, Cayota A. HIV-1 induced decrease of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression during in vivo and in vitro infection. *Clin Immunol.* 2008 Apr;127(1):26-33.
- 226.** Akaike T, Maeda H. Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 2000; 101: 300-308.
- 227.** Chen F, Demers M. Nitric oxide inhibits HIV tat-induced NF-kB activation. *American Journal of Pathology.* Vol. 155, No. 1, July 1999: 275-284.

- 
- 
- 228.** Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Rohenadl C, Lowenstein JM, et al. Antiviral mechanisms of nitric oxide: inhibition of viral proteinase. *Immunity* 1999;10:21-8.
- 229.** Achike FI. The L-arginine-nitric oxide pathway: a potential therapeutic target in dengue haemorrhagic fever. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Oct;35(10):1135-6.
- 230.** Pacher P, Beckman J, Llaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2007 January ; 87(1): 315–424.
- 231.** Cao W, Sun B, Feitelson MA, Wu T, Tur-Kaspa R, Fan Q. Hepatitis C virus targets over-expression of arginase I in hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer*. 2009 Jun 15;124(12):2886-92.
- 232.** Garcia-Mediavilla MV, Sanchez-Campos S, Gonzalez-Perez P, Gómez-Gonzalo M, Majano PL, López-Cabrera M. 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;43:606–613.
- 233.** Cieslik K, Zhu Y, Wu KK. Salicylate suppresses macrophage nitric-oxide synthase-2 and cyclo-oxygenase-2 expression by inhibiting CCAAT/enhancer-binding protein-beta binding via a common signaling pathway. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51):49304-10.
- 234.** Gochee PA, Jonsson JR, Clouston AD, Pandeya N, Purdie DM, and Powell EE. Steatosis in chronic hepatitis C: association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor-alpha and cytochrome P450 2E1. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 386–392, 2003.
- 235.** Akaike T, Fujii S, Kato A, Yoshitake J, Miyamoto Y, Sawa T. Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB J*. 2000;14:1447–1454.
- 236.** Masuda M, Nishino H, Oshima H. Formation of 8-nitro-guanosine in cellular RNA as a biomarker of exposure to reactive nitrogen species. *Chem Biol Interact*. 2002;139:187–197.
- 237.** Poole AM, Logan DT, Sjöberg BM: The evolution of the ribonucleotide reductases: much ado about oxygen. *J Mol Evol* 2002, 55(2):180-196.

- 
- 
- 238.** Torrents E, Sahlin M, Sjöberg B-M: The ribonucleotide reductase family - Genetics and genomics. In: Ribonucleotide Reductase. Edited by Andersson KK. New York: Nova Science Publishers; 2008: 17-77.
- 239.** Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, Nakajima Y, Ishikawa H, Mitsuyoshi H, Sakamoto Y, Okanoue T, Kashima K, Nakamura H, and Yodoi J. Serum thioredoxin levels as an indicator of oxidative stress in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2000, 33: 616–622.
- 240.** Lepoivre M, Flaman JM, bobé P, Lemaire G, Henry Y. Quenching of the tyrosil free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269: 21891-7.
- 241.** Chiang HC, Lo JC, Yeh KC. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. *Environ Sci Technol*. 2006 Nov 1;40(21):6792-8.
- 242.** Chiaverini N, De Ley M. Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic Res*. 2010 Jun;44(6):605-13.
- 243.** Kedzierska K, Crowe SM. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother*. 2001 May;12(3):133-50.
- 244.** Fried MW. The role of triple therapy in HCV genotype 1-experienced patients. *Liver Int*. 2011 Jan;31 Suppl 1:58-61.