



El ácido acetilsalicílico inhibe la replicación del virus de la hepatitis a través de la vía de señalización de la ciclooxigena-2

K. C. TRUJILLO MURILLO*, F. J. BOSQUES PADILLA**, JAVIER RAMOS JIMÉNEZ***, H. G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ *, A. M. RIVAS ESTILLA*



La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) representa la causa más frecuente de enfermedad hepática en el mundo, afecta 3% de la población mundial.¹ En México figura dentro de las principales causas de cirrosis y trasplante hepático.²

En la mayoría de estos pacientes, la respuesta inmune es incapaz de eliminar el virus, lo que conlleva a una infección persistente, que puede progresar a hepatitis crónica, cirrosis e incluso carcinoma hepatocelular (CHC).³ El tratamiento actual para combatir el VHC se basa en la combinación de interferón alfa pegilado (INF-PEG) y Ribavirina (RBV), que consigue tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) de 50 a 60% de los casos.⁴ Por lo que surge la necesidad de desarrollar nuevas drogas antivirales que bloqueen eficientemente la replicación del virus.⁵ El estudio de los mecanismos moleculares de replicación del VHC se ha visto enormemente favorecido con el desarrollo del sistema de replicones subgenómicos

del VHC,⁶ que son capaces de producir nuevas moléculas subgenómicas, las cuales a su vez pueden continuar replicándose, pero no son capaces de producir virus completos e infecciosos, convirtiéndose en un sistema seguro para trabajar.⁷

Recientemente se reportó que el ácido acetilsalicílico (AAS, aspirina) y el salicilato de sodio inhiben la replicación *in vitro* de algunos *flavivirus*, específicamente del virus del dengue (DENV) y de encefalitis japonesa (JEV),⁸ sin embargo, los mecanismos no han sido claramente elucidados. Asimismo, existen antecedentes de que el AAS bloquea la replicación del virus de la influenza.⁹ El AAS es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ampliamente utilizado, que bloquea irreversiblemente la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX), lo que disminuye la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos.¹⁰ Se han descrito tres isoformas de la enzima COX: COX-1, COX-2 y COX-3.¹¹ Estudios previos sugieren que la expresión aumentada de COX-2 y de prostaglandina E₂ (PGE₂) modula la replicación de algunos virus como:

□ El presente artículo está basado en la investigación "El ácido acetilsalicílico inhibe la replicación del virus de la hepatitis a través de la vía de señalización de la ciclooxigena -2", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2009 en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2009.

*Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, FM-UANL.

**Servicio de Gastroenterología.

***Infectología, Hospital Universitario "Dr. José E. González", UANL.

citomegalovirus, gammaherpesvirus y el VHB.¹² Asimismo, se sabe que los salicilatos son capaces de activar la vía de señalización de las proteínas cinasas mitógeno activadas (MAPK), las cuales a su vez regulan la expresión de COX-2, que es un intermediario de la vía de estrés oxidativo, estado oxidante inducido por el VHC en la célula huésped (hepatocito). Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar la participación de las enzimas COX-2 y MAPK (MEK1/2, p38 y JNK) en la regulación de la replicación del VHC, con el propósito de identificar potenciales blancos terapéuticos para combatir y erradicar la infección por el VHC.

Objetivo

Evaluar el efecto del AAS en la replicación y expresión génica del VHC, así como los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la replicación e inhibición del VHC.

Material y métodos

Cultivo celular y tratamiento con aspirina

Se utilizó la línea celular de hepatocitos humanos Huh7 que expresa establemente las proteínas no estructurales del VHC⁷ genotipo 1b (replicón subgenómico) y la línea celular parental (sin replicón). Las células fueron expuestas a AAS (2, 4 y 8 mM) e incubadas durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se realizaron ensayos de viabilidad celular (reducción de azul alamar), se cuantificaron los niveles de las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) como indicadores de daño hepático, y se midieron los niveles intracelulares de PGE₂.

También se realizó la cuantificación relativa del RNA viral por RT-PCR cuantitativa en tiempo real y la identificación de las proteínas virales (NS5A y NPT-II) y celulares (actina y COX-2) por western blot.

Constructos genómicos

El plásmido, que contiene el promotor de COX-2-P2-1900-Luc (-1796, +104) con dos sitios de unión para el factor de transcripción NF-κB, y el plásmido COX-2P2-431-NF-κB mut-Luc que tiene mutado los dos sitios de unión, fueron generosamente donados por el Dr. Miguel A. Íñiguez, del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", en Madrid, España.¹³ También se utilizaron dos constructos bicistrónicos: uno de éstos contenía el sitio interno de entrada al ribosoma (VHC-IRES), y el otro, además del VHC-IRES, contenía la región 3' no traducible (3'UTR). Ambos regulados por el promotor de la T7 RNA polimerasa y río abajo el gen reportero luciferasa.¹⁴

Ensayos de transfección transitoria

Un día antes de la transfección 1×10^4 , células Huh7 parental fueron sembradas. Al siguiente día, las células fueron infectadas durante una hora con el virus vaccinia recombinante (que expresa a la T7 RNA polimerasa),¹⁵ seguido de la transfección con el plásmido que expresa el gen de interés bajo el control del promotor de la T7. Las células se incubaron con medio, sin suero, a 37°C, por seis horas, seguido de la adición de medio con suero y se incubaron por un tiempo adicional de 48 horas. Posteriormente, las células se cosecharon y se cuantificó la actividad de luciferasa.

Cuantificación relativa de la actividad de luciferasa

Las células transfectadas fueron lisadas de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial Promega (Madison, WI, USA), y se hizo la cuantificación relativa de la actividad de luciferasa en un luminómetro de la marca Turner Biosystems. En todos los experimentos de transfección se incluyó la cuantificación de luciferasa de renilla que sirvió para normalizar los ensayos de transfección.¹⁶

Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo a partir de las células Huh7 VHC replicón, y se utilizó el reactivo Trizol (Life Technologies), de acuerdo con las especificaciones de la compañía. El RNA se precipitó y se lavó una sola vez con etanol a 70%, y se resuspendió en 30 mL de agua libre de RNasa.

Cuantificación relativa del RNA viral por RT-PCR en tiempo real

El RNA total extraído se sujetó a retrotranscripción (RT) con el kit High-Capacity cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se utilizaron 200 ng de cDNA como templado para la PCR cuantitativa en tiempo real, y se empleó el termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Para la PCR se diseñó un par de iniciadores sobre la región 5'UTR del VHC. La secuencia de los iniciadores y de la sonda se mencionan a continuación: Primer 1 (+75-93 nt) 5'-GCGTCTAGCCATGGCGTTA-3'; Primer 2 (+138-157 nt) 5'-GGTTCGCGAGACCACTATGG-3'; y la sonda (+194-110 nt) 5'-FAM-CTGCACGACACTCATAC-NFQ-3'. Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial a 50°C por 2 minutos, luego a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y a 60°C por 60 segundos. Cada reacción de PCR incluyó 12.5 mL de Taqman Universal PCR Master Mix, 1.25 mL del ensayo 20X y 11.25 mL del cDNA diluido en agua DEPC (dietil pirocarbonato). Para normalizar la cuantificación relativa de los niveles del RNA viral se amplificó bajo las mismas condiciones al gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH: Applied Biosystems, ensayo 20X No. 4326317E).

Extracción de proteínas totales y western blot

Las proteínas se extrajeron como se describe previamente.¹⁴ Cuarenta microgramos de proteína

total fueron separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana PVDF (Polyvinylidene fluoride, Amersham Biosciences). La membrana se incubó con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpos monoclonales, anti-VHC NS5A (dilución 1:1000, Biodesign International), antiactina (dilución 1:5000, MP Biomedicals), anti-COX-2 (dilución 1:500; Cayman), antiluciferasa (dilución 1:1000; Serotec), y el anticuerpo policlonal: anti-NPT-II (dilución 1:1000; Cortex Biochem), a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron: antirrátón y anticonejo (dilución 1:1000; Promega) conjugado con peroxidasa de rábano. Después de incubar la membrana con el anticuerpo secundario por 2 horas a 4°C, la reacción se visualizó con un kit de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotechnology), de acuerdo con las especificaciones de la compañía.

Cuantificación de PGE₂ intracelular

Para cuantificar los niveles intracelulares de PGE₂ se utilizó un kit de ELISA, de la marca Amersham Biosciences (Freiburg, Germany).

Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados fueron promediados \pm su desviación estándar (SD), y se analizaron con las pruebas de ANOVA de un factor, prueba de Dunnett, Bonferroni. Para ello se utilizaron los programas estadísticos SPSS versión 11.5, y Epi Info versión 3.3.2. Se consideró estadísticamente significativo si el valor de $^*P < 0.05$.

Resultados

El AAS disminuye los niveles del RNA viral en las células Huh7 VHC replicón: efecto dosis-dependiente

Las células Huh7 VHC replicón se expusieron a concentraciones crecientes de AAS (2-8 mM) y se incubaron a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), como control se utilizaron células replicón sin tratamiento. Postratamiento: se hizo la extracción del RNA total que se sujetó a RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se observó que el AAS disminuyó los niveles del RNA viral en una forma dosis-dependiente, comparado con las células con-

trol, y mostró un mayor efecto a la concentración de 8 mM (figura 1A). Además, el efecto de regulación negativa dependió del tiempo de exposición, y se observó una mayor inhibición a las 72 horas de postratamiento (figura 1A). Existen reportes de que los salicilatos a concentraciones de 1-5 mM se emplean en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas; sin embargo, concentraciones mayores a 6.5 mM ya son tóxicas para su uso

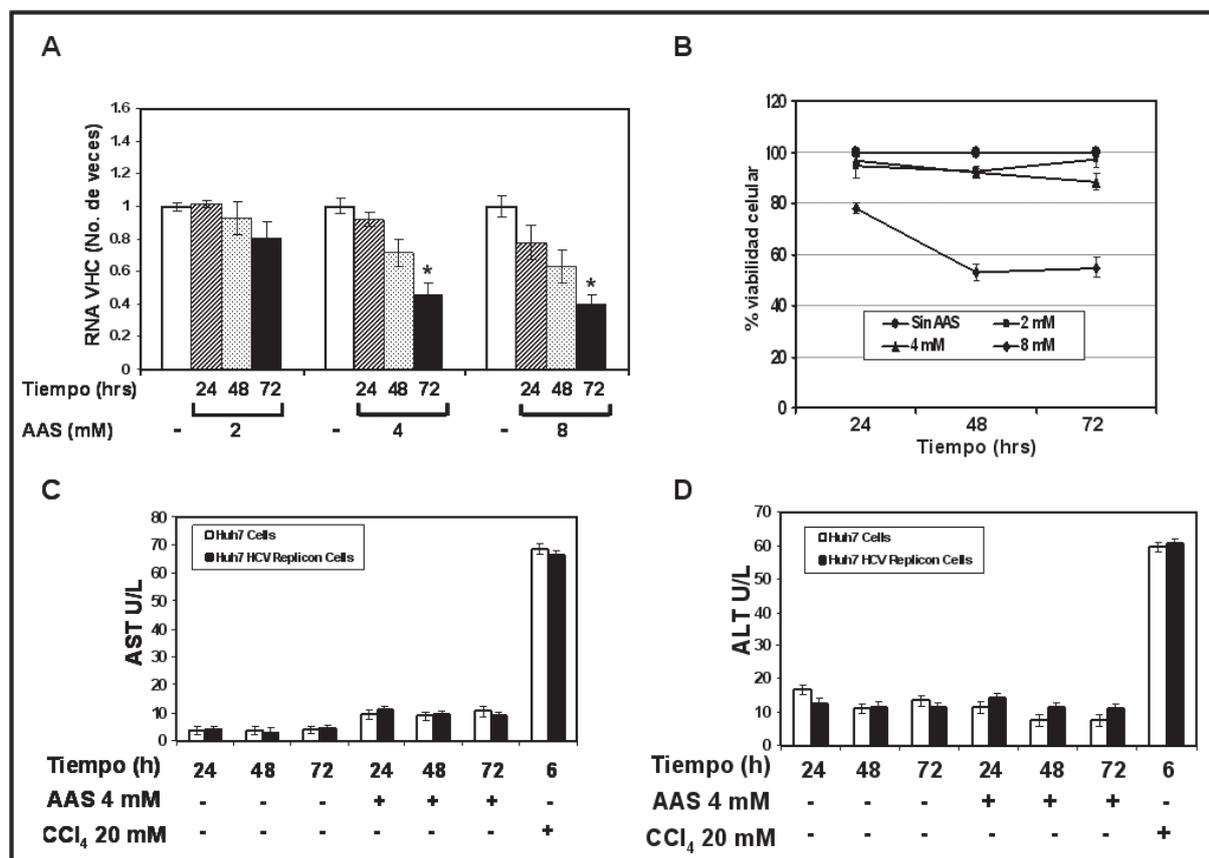


Fig. 1. Efecto del AAS en los niveles del RNA viral. (A) Efecto del AAS en los niveles del RNA viral en las células Huh7 VHC replicón. 2×10^5 células sembradas en placas de seis pozos fueron tratadas con aspirina (2, 4 y 8 mM) o sin aspirina durante 24, 48 y 72 horas. Postratamiento: los niveles del RNA viral fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real con sondas Taqman (Applied Biosystems). Los niveles del RNA viral fueron normalizados con base en la relación VHC/GAPDH RNAm. Los resultados se presentan como niveles del RNA del VHC (número de veces) comparado con el control (células sin tratamiento) que se define como 1.0. Los valores corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos, y en cada uno de ellos se incluyeron tres réplicas (* $P < 0.05$). (B) Evaluación de viabilidad celular. Las células Huh7 VHC replicón fueron tratadas con aspirina a las concentraciones indicadas e incubadas por 24, 48 y 72 hrs. Posteriormente se determinó el porcentaje de células vivas y se comparó con las células sin tratamiento (100% de viabilidad). (C, D) Cuantificación de los niveles de AST y ALT. Células Huh7 VHC replicón y parental fueron tratadas en presencia o ausencia de aspirina (4 mM) e incubadas por 24, 48 y 72 horas. Posteriormente los niveles de AST y ALT fueron cuantificados. Como control positivo de daño hepático las células fueron tratadas con 20 mM de CCl₄ por seis horas.

clínico.⁸ Para confirmar que las concentraciones de aspirina que se estaban utilizando no eran tóxicas para las células, se realizó un ensayo de viabilidad celular. En la figura 1B se muestra que no existe diferencia significativa en el porcentaje de las células vivas que se detectó en las células sin tratamiento (100% de viabilidad) y las células que fueron tratadas con 2 y 4 mM de AAS, contrario a lo observado en las células que fueron tratadas con 8 mM, donde el porcentaje de células vivas fue menor (58%). Con base en lo anterior, se decidió utilizar la concentración de 4 mM (720 mg) de aspirina; y para confirmar que esta concentración de AAS no induce a daño celular, se cuantificaron los niveles de las enzimas hepáticas AST y ALT en el sobrenadante de células Huh7 VHC replicón y Huh7 parental con y sin tratamiento de aspirina. Como control positivo de daño celular, las células fueron tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4 ; 20 mM) por seis horas. La figura 1C sugiere que la aspirina (4 mM) aumentó ligeramente los niveles de AST en ambas líneas celulares (comparado con las células no tratadas), sin embargo este efecto no reflejó un daño celular significativo. Con respecto a los niveles de ALT, éstos no presentaron cambios significativos entre las células que fueron tratadas con aspirina y las células sin tratamiento (figura 1D). En conjunto, todos los resultados demuestran que la aspirina a la concentración de 4 mM no es tóxica ni citotóxica para las células.

Para investigar si el efecto antiviral de la aspirina era dependiente del tiempo de exposición, las células replicón fueron tratadas con 4 mM de AAS e incubadas a diferentes tiempos (figura 2). Al finalizar el tiempo de exposición, el RNA total se extrajo y se sujetó a RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se observó que el efecto de inhibición del AAS en la replicación del VHC fue más evidente a las 72 horas de postratamiento, debido a que el RNA viral disminuyó hasta en 58%, comparado con las células que no se trataron con aspirina (control negativo) (figura 2).

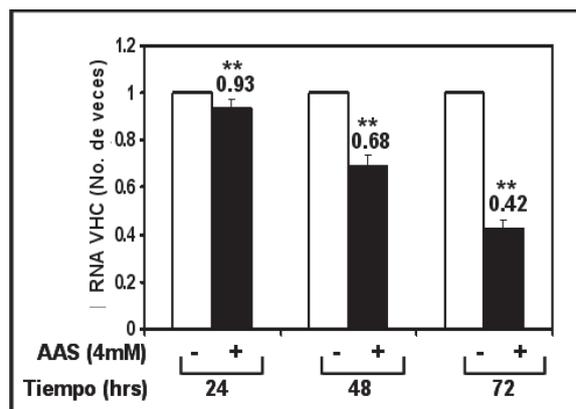


Fig. 2. El efecto antiviral del AAS es dependiente del tiempo de exposición. 2×10^5 células Huh7 VHC replicón sembradas en placas de seis pozos fueron tratadas con AAS (4 mM) o sin AAS durante 24, 48 y 72 h. Postratamiento: los niveles del RNA viral fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real con sondas Taqman. Los niveles del RNA del VHC fueron normalizados con base en la relación VHC/GAPDH RNAm. Los resultados se presentan como niveles del RNA del VHC (número de veces) con respecto al control (células sin tratamiento) que se define como 1.0. Los valores corresponden al promedio \pm DS de tres experimentos, y en cada uno de éstos se incluyeron tres réplicas (**P < 0.01).

La aspirina disminuye la expresión de las proteínas del VHC en las células Huh7 VHC replicón

Para evaluar si el AAS también tenía un efecto de regulación negativa en los niveles de las proteínas virales, las células Huh7 VHC replicón se incubaron en presencia o ausencia de aspirina (4 mM) durante 24, 48 y 72 hrs. Posteriormente, las células fueron cosechadas y se extrajeron las proteínas totales que se sujetaron a western blot. Se observó que a las 72 hrs de postratamiento los niveles de las proteínas virales NS5A y NPT-II disminuyeron hasta 0.68 y 0.80 veces menos, comparado con las células que no fueron tratadas con AAS (figura 3, línea 6). Estos resultados sugieren que la aspirina no sólo disminuyó los niveles del RNA del VHC sino también los niveles de las proteínas virales NS5A y NPT-II.

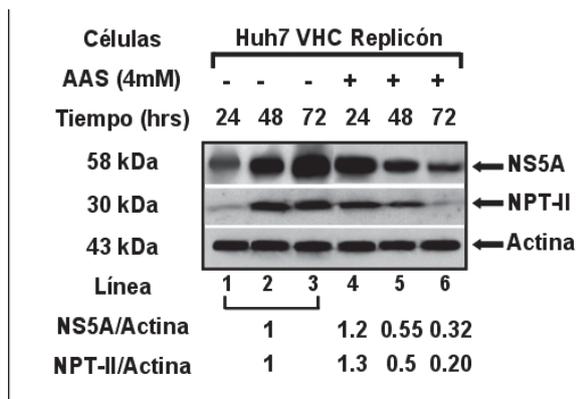


Fig. 3. Efecto del AAS en los niveles de las proteínas virales NS5A y NPT-II. 5×10^5 células Huh7 VHC Replicón sembradas en placas de 35×10 mm fueron incubadas en presencia (líneas 4-6) o ausencia (líneas 1-3) de 4 mM de AAS durante 24, 48 y 72 h. Cuarenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el western blot para detectar los niveles de las proteínas NS5A, NPT-II (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas NS5A/actina y NPT-II/actina fue semicuantificada con el programa Phoretix\1D versión 2003.02.

El efecto de regulación negativa del AAS no es mediado por las regiones reguladoras 5' y 3'UTR del VHC

Para investigar si el efecto antiviral de la aspirina involucra las regiones 5' y 3'UTR del VHC, constructos bicistrónicos que contienen estas regiones, además del gen reportero luciferasa fueron transfectados transitoriamente en las células Huh7 parental (sin replicón). Seis horas postransfección las células fueron tratadas con AAS (4 mM) e incubadas por un tiempo adicional de 48 hrs. En todos los ensayos de transfección se incluyó la cuantificación de luciferasa de renilla que sirvió para normalizar los ensayos de transfección. En la figura 4 se muestra que no hubo cambios significativos en la actividad de luciferasa con el tratamiento de aspirina, lo que sugiere que el efecto de inhibición de la aspirina en la replicación y expresión génica del VHC (figuras 1-3) es independiente de la participación de las regiones reguladoras 5'(figura 4A) y 3'(figura. 4B) UTR virales.

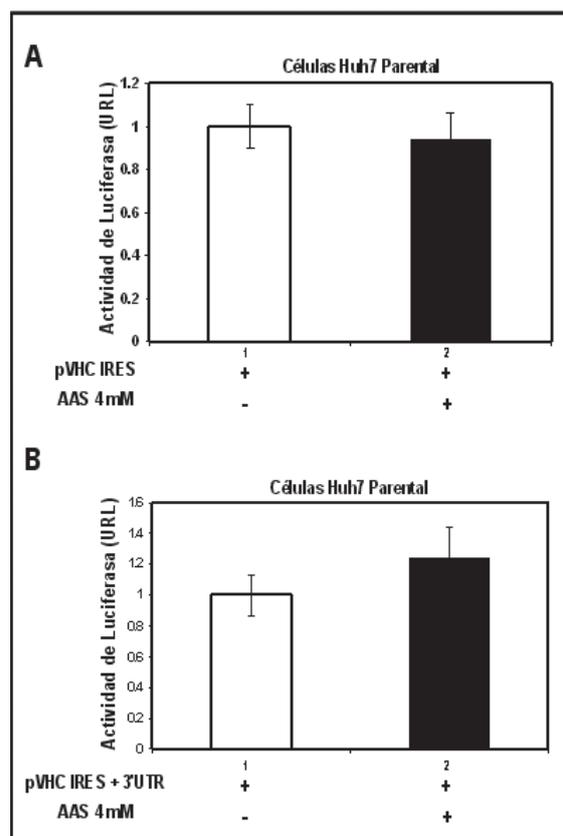


Fig. 4. El efecto del AAS en la replicación del VHC no involucra las regiones reguladoras 5' y 3'UTR. Las células Huh7 parental (1×10^4 células) fueron infectadas y transfectadas transitoriamente con el plásmido (A) pVHC-IRES o el plásmido (B) pVHC-IRES + 3'UTR que contenían al gen reportero luciferasa. Postransfección: las células fueron incubadas en medio sin suero por seis horas, luego fueron expuestas a aspirina e incubadas por un tiempo adicional de 48 hrs. Posteriormente, se realizó la cuantificación relativa de la actividad de luciferasa. Los valores corresponden al promedio DS de tres experimentos, y en cada uno de ellos se incluyeron tres réplicas. Los resultados son expresados como unidades relativas de luciferasa (URL) con respecto al control (sin tratamiento) que se define como 1.0.

El efecto antiviral de la aspirina parece ser mediado por el bloqueo de COX-2

El mecanismo de acción de los AINEs consiste en bloquear la actividad de la enzima COX-1/2, disminuyendo la síntesis de PGE_2 . Estudios previos sugieren que la expresión aumentada de COX-2 y de prostaglandina PGE_2 modula la replicación

del algunos virus como: citomegalovirus, gammaherpesvirus y el VHB.¹² Para investigar el/los mecanismo(s) responsables del efecto de regulación negativa del AAS, se evaluó el efecto de la aspirina a nivel de la proteína, actividad enzimática y transcripcional de COX-2. Se encontró que el tratamiento con AAS (4 mM) disminuyó los niveles de la proteína COX-2 (figura 5A) y de PGE₂ (figura 5B) en las células Huh7 VHC replicón a las 24, 48 y 72 hrs. También se observó que la aspirina no regula la actividad transcripcional de COX-2, debido a que las células que fueron transfectadas con el plásmido que contiene los dos sitios de unión para NF- κ B y con el plásmido que tiene mutados estos sitios de unión, y que además fueron tratadas con AAS no mostraron diferencias significativas en la actividad transcripcional de COX-2 comparadas con las células sin tratamiento (figura 5C).

La inhibición de p38 y MEK1/2, pero no de JNK, revierte el efecto inducido por la aspirina

Existen antecedentes de que los salicilatos son capaces de activar la vía de señalización de las proteínas cinasas mitógeno activadas (MAPK),¹⁷ las cuales a su vez regulan la expresión de COX-2, que es un intermediario de la vía de estrés oxidativo. Por lo anterior, se evaluó si el efecto antiviral de la aspirina estaba regulado por la activación de la vía de las MAPK. Los resultados sugieren que los inhibidores SB203580 y U0126 que actúan sobre p38 y MEK1/2, respectivamente, revirtieron parcialmente el efecto negativo del AAS en la expresión de las proteínas virales (figuras 6A y 6B).

Los resultados sugieren que los inhibidores SB203580 y U0126 que actúan sobre p38 y MEK1/2, respectivamente, revirtieron parcialmente el efecto negativo del AAS en la expresión de las proteínas virales (figuras 6A y 6B). Contrario a lo observado, cuando las células replicón fueron tratadas con el inhibidor SP600125 (actúa sobre JNK), donde los niveles de la proteína viral NS5A disminuyeron dramáticamente (figura 6C).

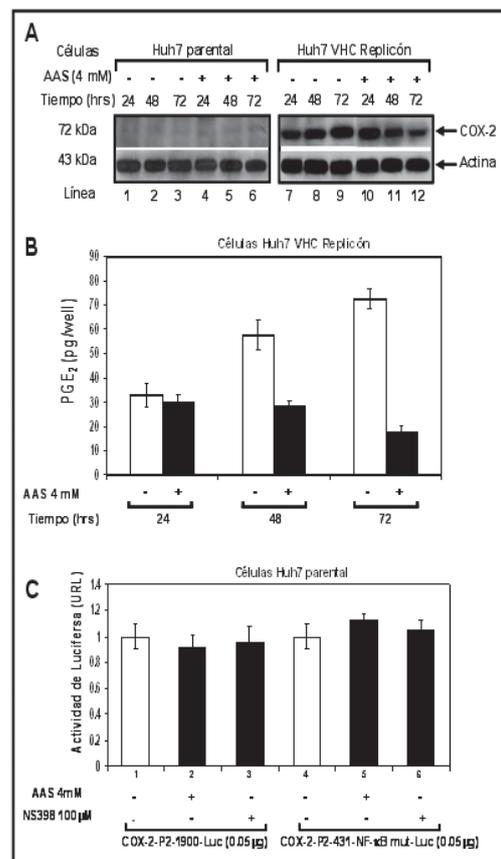


Fig. 5. Efecto del AAS en los niveles de la proteína, actividad enzimática y transcripcional de COX-2. (A) Niveles de la proteína COX-2. 5×10^5 células Huh7 Parental y Huh7 VHC replicón fueron incubadas en presencia o ausencia de aspirina durante 24, 48 y 72 hrs. Posteriormente se detectaron los niveles de las proteínas COX-2 (panel superior) y actina (panel inferior) por western blot. La relación de las proteínas COX-2/actina fue analizada con el programa Phoretix\1D versión 2003.02. (B) Actividad enzimática de COX-2. 1×10^4 células Huh7 parental y Huh7 VHC replicón fueron tratadas en presencia o ausencia de AAS durante 24, 48 y 72 hrs. Postratamiento: se cuantificaron los niveles intracelulares de PGE₂. Los valores representan el promedio DS de tres experimentos y en cada uno de ellos se incluyeron tres réplicas. (C) Actividad transcripcional del promotor de COX-2. Las células Huh7 parental fueron infectadas, transfectadas con el plásmido COX-2-P2-1900-Luc o COX-2-P2-431-NF- κ B mut-Luc, y expuestas a aspirina o NS398 por 48 hrs. Postratamiento: se realizó la cuantificación relativa de la actividad de luciferasa. Los valores representan el promedio DS de tres experimentos y en cada uno de ellos se incluyeron tres réplicas. Los resultados son expresados como unidades relativas de luciferasa (URL) con respecto al control (sin tratamiento) que se define como 1.0.

Estos resultados fueron confirmados con la tecnología de RNA de interferencia (RNAi) (datos no mostrados). Para ello las células Huh7 replicón se incubaron en presencia o ausencia de aspirina 30 minutos antes de la transfección. Enseguida, las células fueron transfectadas con un RNAi dirigido contra p38 MAPK (20 nM) o con un RNAi contra MEK1 (100 nM). Se obtuvieron resultados similares a los observados en la figura 6.

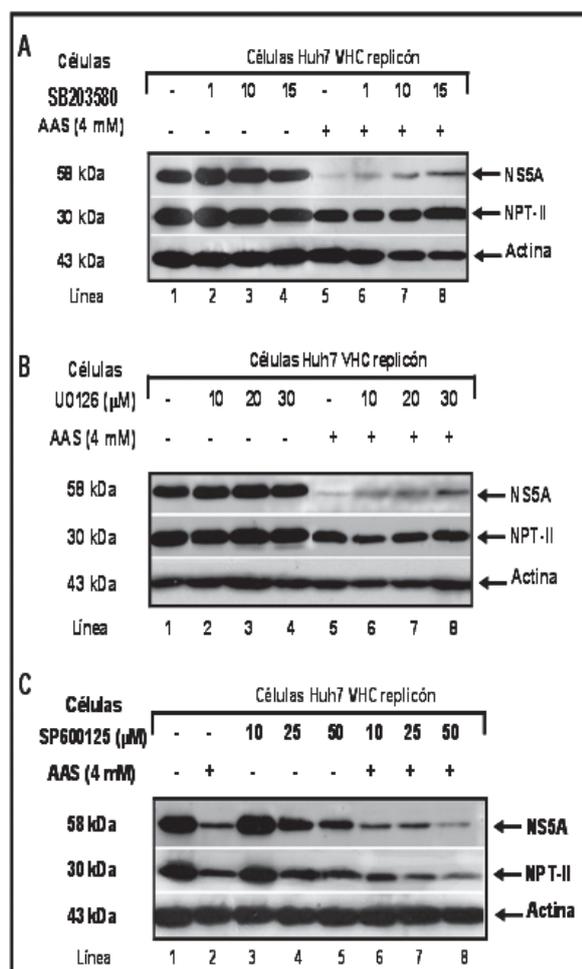


Fig. 6. La aspirina disminuye la expresión de las proteínas virales y este efecto es modulado por p38 y MEK1/2 pero no por JNK MAPK. 5×10^5 células Huh7 VHC replicón fueron incubadas en presencia o ausencia de AAS (4 mM) y con los inhibidores (A) SB203580, (B) U0126 y (C) SP600125 por 48 hrs. Cuarenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el western blot para detectar los niveles de las proteínas NS5A y NPT-II (panel superior) y actina (panel inferior).

En conjunto, todos estos resultados sugieren que la activación de la vía MAPK puede tener un papel importante en la regulación de la replicación del VHC por el AAS en las células Huh7 VHC replicón.

Discusión

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa emergente de gran importancia médica a nivel mundial, debido a tres razones principales: primero; por el significativo número de personas infectadas (~170 millones de individuos en el mundo); segundo, la hepatitis crónica por el VHC puede progresar a cirrosis, con el desarrollo posterior de carcinoma hepatocelular (CHC); tercero, actualmente la única terapia disponible es el tratamiento combinado de interferón alfa pegilado (INF-PEG) y Ribavirina. Además, la infección por el VHC se ha convertido en la principal causa de trasplante hepático.

Existen reportes de que los salicilatos presentan un efecto antiviral contra algunos *flavivirus*, específicamente contra el virus del dengue (DEN) y el virus de encefalitis japonesa (JEV),¹⁶ y más recientemente contra el virus de la influenza.⁹ Además, existe evidencia de que los salicilatos son capaces de activar la vía de señalización de las proteínas cinasas mitógeno activadas (MAPK), que a su vez regulan la expresión de COX-2.¹⁷ El ácido acetilsalicílico (AAS, aspirina) es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ampliamente utilizado a nivel mundial y comúnmente administrado por prescripción o automedicación. Su mecanismo de acción consiste en bloquear irreversiblemente la actividad de la enzima COX (COX-1/2) al acetilar su sitio activo en el residuo serina 530,¹⁹ esto ocasiona una disminución en la producción de prostaglandinas E₂ (PGE₂). La expresión de COX-2 y PGE₂ se ha asociado con la regulación de la replicación de algunos virus como: el virus de la hepatitis B, citomegalovirus humano y gammaherpesvirus, así como, con el desarrollo de fibrosis y CHC en humanos.^{24,25}

Con base en lo anterior, nos propusimos evaluar el efecto de la aspirina en la replicación y expresión de las proteínas virales en el sistema de replicones subgenómicos del VHC, así como la participación de la proteína celular COX-2 y la vía MAPK (p38, MEK1/2 y JNK) en la regulación de los mecanismos de replicación del VHC. Nuestros resultados demuestran que la aspirina (4 mM) posee un efecto antiviral *in vitro* contra el VHC, debido a que el AAS no sólo disminuyó los niveles del RNA viral (hasta un 58%; figuras 1-2), sino también los niveles de las proteínas virales NS5A y NPT-II (figura 3). Además, este efecto fue dependiente del tiempo de exposición siendo más evidente a las 72 horas postratamiento. Se observó con interés que el AAS en las células Huh7 VHC replicón disminuyó los niveles de la proteína COX-2 (figura 5A), así como su actividad enzimática (figura 5B). Este último efecto confirma el mecanismo de acción de la aspirina: bloquear la actividad de COX-2, lo que conlleva a una disminución en la producción de PGE₂. Aunque el AAS mostró una tendencia a la disminución de la actividad transcripcional de COX-2, este efecto estadísticamente no fue significativo ($P=NS$) (figura 5C, línea 2). El resultado sugiere que la regulación de la aspirina en la expresión de COX-2 no es a nivel transcripcional y que además no es mediada por la unión del factor de transcripción NF- κ B, debido a que en las células transfectadas con el plásmido que contiene dos copias de NF- κ B o con el plásmido que tiene mutados los dos sitios de unión para NF- κ B, y que además fueron tratadas con AAS o NS398 no mostraron diferencias significativas en la actividad transcripcional de COX-2, comparado con las células sin tratamiento (definido como 1) (figura 5C, líneas 1, 5).

Se observó además que en las células Huh7 VHC replicón, los inhibidores de MEK1/2 (SB203580) y p38 (U0126) revirtieron parcialmente el efecto negativo de la aspirina en la expresión de las proteínas del VHC (figuras 6A y 6B, líneas 6-8). Sin embargo, en presencia del AAS y del inhibidor de JNK (SP600) se observó un efecto

sinérgico en la disminución de las proteínas virales (figura 6C, líneas 6-8). Estos resultados sugieren que la vía de señalización de las MAPKs parece mediar el efecto negativo inducido por la aspirina en la replicación y expresión de las proteínas del VHC.

Conclusión

En resumen, nuestros resultados demuestran que la aspirina presenta propiedades antivirales *in vitro* contra el VHC. Efecto que parece ser modulado por la vía COX-2/MEK1/2/p38 MAPK. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que la aspirina podría ser un excelente adyuvante en el tratamiento de la infección crónica por VHC.

Agradecimientos

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (Paicyt) SA1010-04 y el PROMEP 103.5/04/2590, por el apoyo económico brindado para la realización de éste proyecto.

Resumen

Existen reportes de que el salicilato de sodio y la aspirina disminuyen la replicación de flavivirus. Por lo anterior, se consideró importante estudiar el efecto del AAS contra el VHC. Para ello se evaluó el efecto del AAS en la replicación y expresión de las proteínas virales, en el sistema de replicones subgenómicos del VHC. Las células fueron incubadas con 2-8 mM de AAS a diferentes tiempos y se determinaron los niveles del RNA y proteínas virales por PCR en tiempo real y western blot, respectivamente. Se observó que el AAS disminuyó los niveles del RNA y proteínas virales. También se encontró que el VHC indujo la expresión, síntesis y actividad de COX-2. Efectos que fueron regulados negativamente por AAS. Así mismo, la inhibición de p38 y MEK1/2 revirtió el efecto del AAS. Nuestros resultados sugie-

ren que el efecto antiviral del AAS puede estar mediado por la vía COX-2/p38/MEK1/2; y la posibilidad de que el AAS podría ser un excelente adyuvante en el tratamiento de la infección crónica por VHC.

Palabras clave: Ácido acetilsalicílico (AAS); Virus de la hepatitis C (VHC), Ciclooxigenasa-2 (COX-2); Proteínas cinasas mitógeno activadas (MAPK); Antiinflamatorio no esteroideo (AINE).

Abstract

It has been reported that sodium salicylate and aspirin inhibit the replication of *flaviviruses*. Therefore, we considered it important to test whether ASA had anti-HCV activity. To this end, we examined the effects of ASA on viral replication and protein expression, using an HCV subgenomic replicon cell culture system. We incubated these cells with 2-8 mM ASA at different times and measured HCV-RNA and protein levels by real time PCR and western blot analysis, respectively. We found that ASA has suppressive effect on HCV-RNA and protein levels. We also observed that HCV-induced the expression, synthesis, and activity of COX-2; these effects were down-regulated by ASA. Inhibition of p38 and MEK1/2 MAPK prevented the antiviral effect of ASA. Our findings suggest that the anti-HCV effect of ASA can be mediated by COX-2/p38/MEK1/2 pathway; and the possibility that ASA could be an excellent adjuvant in the treatment of chronic HCV infection.

Keywords: Acetylsalicylic acid (ASA), Hepatitis C virus (HCV), Cyclooxygenase-2 (COX-2); Mitogen activated protein kinase (MAPK); Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID).

Referencias

1. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 1999;6:35-47.
2. Méndez-Sánchez N., Aguilar-Ramírez J.R., Reyes A., Dehesa M, Juárez A., Castaneda B., Sánchez-Ávila F, Poo JL, Guevara González L, Lizardi J., Valdovinos M.A., Uribe M., Contreras A.M., Tirado P, Aguirre J, Rivera-Benítez C, Santiago-Santiago R, Bosques-Padilla F., Muñoz L., Guerrero A., Ramos M., Rodríguez-Hernández H., Jacobo-Karam J. Etiology of liver cirrhosis in México. *Ann Hepatol* 2004;3:30-3.
3. Highleyman L. Natural history and treatment of hepatitis C. *Beta* 1999;12:16-29.
4. Feld J.J., Hoofnagle J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005;436:967-72.
5. Neyts J. Selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antiviral Res* 2006;71:363-71.
6. Bartenschlager R., Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001;52:1-17.
7. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999;285:110-3.
8. Liao C..L, Lin YL, Wu BC, Tsao CH, Wang MC, Liu CI, Huang YL, Chen JH, Wang JP, Chen L.K. Salicylates inhibit flavivirus replication independently of blocking nuclear factor kappa B activation. *J Virol* 2001;75:7828-39.
9. Mazur I., Wurzer W.J., Ehrhardt C, Pleschka S, Puthavathana P, Silberzahn T., Wolff T., Planz O, Ludwig S. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol* 2007.
10. Copeland, R.A., Williams JM, Giannaras J, Nurnberg S., Covington M., Pinto D, Pick S, Trzaskos J.M.. Mechanism of selective

- inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11202-6.
11. Shaftel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore A.H., O'Banion MK. COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;119:213-5.
 12. Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J Virol* 2005;79:9725-34.
 13. Íniguez MA, Martínez-Martínez S, Punzón 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;275:23627-35.
 14. Rivas-Estilla AM, Svitkin Y, López Lastra M, Hatzoglou M, Sherker A, Koromilas AE. PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol* 2002;76:10637-53.
 15. Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8122-6.
 16. de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987;7:725-37.
 17. Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced I κ B α phosphorylation and degradation. *Mol Cell Biol* 1998;18:78-84.

Recibido: 16 de agosto de 2009

Aceptado: 10 de septiembre de 2009