

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

“EVALUACIÓN DE LOS ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES) EN LA REPLICACIÓN DEL VHC”

PRESENTA: Q.B.P. DIANA CRSITINA PEREZ IBAVE

EN OPCIÓN A GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

ASESOR: DRA. ANA MARÍA RIVAS ESTILLA

CIUDAD UNIVERSITARIA FEBRERO DEL 2009

INDICE

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGIA DE LA HEPATITIS C.....	1
1.1.2 Prevalencia en México.....	2
1.2 AGENTE ETIOLOGICO.....	2
1.2.1 Proteínas virales del VHC.....	4
1.2.2 Replicación viral del VHC.....	5
1.2.3 Clasificación del VHC.....	6
1.3 VIAS DE TRANSMISIÓN.....	7
1.4 ESPECTRO CLINICO DE LA HEPATITIS.....	8
1.4.1 Hepatitis Aguda.....	8
1.4.2 Hepatitis C crónica.....	9
1.4.3 Fibrosis.....	10
1.4.4 Cirrosis.....	11
1.4.5 Carcinoma Hepatocelular.....	12
1.5 DIAGNOSTICO.....	13
1.5.1 Pruebas hepáticas no específicas.....	13
1.5.1.1 Niveles de transaminasas en suero.....	13
1.5.1.2 Biopsia Hepática.....	14
1.5.2 Fibrotest.....	14
1.5.3 Pruebas virológicas.....	16
1.5.3.1 Análisis serológicos.....	16
1.5.3.2 VHC RIBA.....	16
1.5.3.3 Detección del RNA de VHC.....	17
1.6 TRATAMIENTO PARA LA HEPATITIS.....	18
1.6.1 Mecanismo de acción del Interferón.....	18
1.6.2 Mecanismo de acción de la Ribavirina.....	20
1.6.3 Tipos de INF- α	22
1.6.4 Tipos de respuesta al tratamiento.....	24
1.6.5 Algoritmo del tratamiento de la hepatitis crónica por VHC.....	26
1.6.6 Selección de pacientes aptos para el tratamiento.....	28
1.6.7 Efectos Adversos.....	29
1.7 Terapias emergentes para el tratamiento con hepatitis C.....	30
2. ANTECEDENTES.....	32
2.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).....	32
2.2 INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA DEL VHC INDUCIDO POR ASA.....	32

3. JUSTIFICACIÓN	35
4.OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	36
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	36
5. MATERIALES Y METODOS	37
5.1 REACTIVOS.....	37
5.1.1 Cultivo Celular.....	37
5.1.2 Viabilidad Celular.....	37
5.1.3 Extracción de RNA total en células.....	38
5.1.4 Western Blot	38
5.1.5 PCR cuantitativa en Tiempo real (qPCR).....	38
5.1.6 Niveles Intracelulares de prostaglandinas E ₂ (PGE ₂).....	39
5.1.7 Extracción de RNA viral a partir de plasma.....	39
5.1.8 Niveles séricos de ácido tiobarbitúrico (TBARS) a partir de suero.....	39
5.1.9 Niveles de glutatión peroxidasa (Gpx) a partir de plasma.....	39
5.1.10 Niveles de súper oxido dismutasa (SOD) a partir de suero.....	39
5.1.11 Niveles séricos de transaminasas.....	40
5.1.12 Determinación del Genotipo de VHC.....	40
5.2 EQUIPO.....	40
5.2.1 Cultivo celular.....	40
5.2.2 Western blot.....	40
5.2.3 Extracción de RNA y proteínas totales.....	40
5.2.4 Cuantificación de cDNA y Proteínas totales.....	40
5.2.5 PCR en tiempo real.....	41
5.2.6 Viabilidad celular.....	41
5.2.7 Separación de suero y plasma.....	41
5.2.8 Cuantificación de glutatión peroxidasa (Gpx).....	41
5.2.9 Cuantificación de ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	41
5.2.10 Cuantificación de súper oxido dismutasa (SOD).....	41
5.2.11 Cuantificación de prostaglandinas (PGE ₂).....	41
5.2.12 Cuantificación de transaminasas (ALT y AST).....	41
5.2.13 Biometría Hemática.....	41
5.3 MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
5.3.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo celular.....	42
5.4 ANÁLISIS DE DATOS.....	42
5.5 MÉTODOS.....	42
5.5.1 Tratamiento con DCF, SalNa o INDO.....	43
5.5.2 Extracción de RNA total a partir de células en monocapa.....	43
5.5.3 Cuantificación relativa del RNA viral por RT-PCR en tiempo real.....	44
5.5.4 Extracción de proteínas totales a partir de células en monocapa.....	46
5.5.5 Western Blot.....	47
5.5.6 Niveles intracelulares de PGE ₂	47
5.6 ESTRATEGIA GENERAL ENSAYO IN VIVO.....	48

5.6.1 Criterios de inclusión y exclusión del estudio <i>in vivo</i>	49
5.6.2 Fases del tratamiento con AINES.....	50
5.6.3 Fases del tratamiento estándar INF-PEG α + RBV.....	51
5.6.4 Evaluación de efectos adversos.....	52
5.6.8 Extracción de RNA viral de pacientes VHC positivos.....	53
5.6.9 Determinación de carga viral del VHC por RT-qPCR.....	53
5.6.10 Determinación de TBARS a partir de suero.....	55
5.6.11 Cuantificación de SOD a partir de suero.....	56
5.6.12 Cuantificación de Gpx a partir de plasma.....	56
5.6.13 Determinación del genotipo del VHC.....	57
6. RESULTADOS	62
6.1 Efecto de los AINES (DCF, SalNa e Indo) en los niveles del RNA viral en las células Huh-7 VHC replicón.....	62
6.2 Evaluación de la toxicidad de los AINES (DCF, SalNa e Indo) en las células Huh-7 VHC replicón.....	64
6.3 Evaluación del efecto de los AINES en la expresión de las proteínas células y no estructurales del VHC.....	66
6.4 Actividad enzimática de COX-2.....	70
6.5 Desarrollo e impletación de un método para la cuantificación de la carga viral.....	73
6.6 Evaluación del tratamiento con AINES (AAS y DCF) como monoterapia o terapia combinada (AINES + INF-PEG α + RBV) en la carga viral de pacientes con hepatitis C.....	73
6.7 Determinación de los marcadores de estrés oxidativo (SOD, Gpx y TBBARS) en los pacientes.....	78
6.8 Evaluación de los efectos adversos al tratamiento en los pacientes.....	83
7. DISCUSIÓN	85
8. CONCLUSIONES	92
9. PERSPECTIVAS	93
10. BIBLIOGRAFÍA	94
11. ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de la infección por VHC en las distintas regiones geográficas	2
Figura 2. Partícula viral	3
Figura 3. Procesamiento de la poliproteína del VHC	3
Figura 4. Ciclo de replicación del VHC	6
Figura 5. Distribución de los genotipos de VHC	7
Figura 6. Progresión de la hepatitis C	9
Figura 7. Fibrosis de etiología viral	11
Figura 8. Cirrosis de etiología viral	12
Figura 9. Carcinoma hepatocelular de etiología viral	13
Figura 10. Mecanismo de acción del interferón alfa en contra de VHC	20
Figura 11. Mecanismos de acción de la ribavirina en contra de VHC	22
Figura 12. Respuestas virológicas al tratamiento por VHC	24
Figura 13. Cinética viral durante el tratamiento con INF-PEG α y ribavirina	25
Figura 14. Efecto del AAS en los niveles del RNA viral	33
Figura 15. Efecto del AAS en los niveles de las proteínas virales	33
Figura 16. Efecto del AAS en los niveles de la proteína COX-2	34
Figura 17. Estrategia general ensayo <i>in vitro</i>	42
Figura 18. Estrategia general ensayo <i>in vivo</i>	48
Figura 19. Esquema de tratamiento para pacientes del grupo A y B	50
Figura 20. Esquema de tratamiento para pacientes del grupo C	51
Figura 21. Esquema de los efectos adversos evaluados en los pacientes	52
Figura 22. Efecto del diclofenaco en los niveles del RNA viral	62
Figura 23. Efecto del salicilato de sodio en los niveles del RNA viral	63
Figura 24. Efecto de la indometacina en los niveles del RNA viral	64
Figura 25. Evaluación de la toxicidad del diclofenaco en las células Huh-7 VHC replicón	65
Figura 26. Evaluación de la toxicidad del salicilato de sodio en las células Huh-7 VHC replicón	65
Figura 27. Evaluación de la toxicidad de la indometacina en las células Huh-7 VHC replicón	66
Figura 28. Efecto del diclofenaco en los niveles de la proteína del replicón del VHC	67
Figura 29. Efecto del salicilato de sodio en los niveles de la proteína del replicón del VHC	68
Figura 30. Efecto de la indometacina en los niveles de la proteína del replicón del VHC	69
Figura 31. Efecto del diclofenaco en la actividad enzimática de COX-2 en las células Huh-7 VHC replicón	71
Figura 32. Efecto del salicilato de sodio en la actividad enzimática de COX-2 en las células Huh-7 VHC replicón	72
Figura 33. Efecto de la indometacina en la actividad enzimática de COX-2 en las células Huh-7 VHC replicón	72
Figura 34. Curva estándar de VHC en PCR en tiempo real	73
Figura 35. Variables demográficas y clínicas de los pacientes que ingresaron al protocolo clínico exploratorio	74
Figura 36. Carga viral en los pacientes con hepatitis C crónica que ingresaron al protocolo clínico	76
Figura 37. Promedio del a carga viral de los pacientes del protocolo clínico en las distintas fases del tratamiento	77
Figura 38. Actividad de la enzima SOD en los pacientes	79
Figura 39. Actividad de la enzima Gpx en los pacientes	81
Figura 40. Niveles de peroxidación lipidca (TBARS)	83
Figura 41. Evaluación de los efectos en los pacientes	84

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Funciones de las proteínas y regiones no codificantes del VHC	4
Cuadro 2. Importancia de los diferentes factores de riesgo para la transmisión del VHC	8
Cuadro 3. Escalas para medir la fibrosis en una biopsia hepática	14
Cuadro 4. Marcadores serológicos utilizados para el Fibrotest para determinar el grado de fibrosis	15
Cuadro 5. Conversión del rango del Fibrotest al estado de fibrosis	15
Cuadro 6. Ensayos comerciales cuantitativos para VHC	17
Cuadro 7. Regímenes de tratamiento para hepatitis C	23
Cuadro 8. Factores relacionados con una respuesta favorable a la terapia estándar	26
Cuadro 9. Esquema de tratamiento para pacientes con hepatitis C crónica	27
Cuadro 10. Terapias emergentes para el tratamiento de VHC	31
Cuadro 11. Condiciones de reacción para la RT	44
Cuadro 12. Programa de RT ensayo in vitro	45
Cuadro 13. Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real	45
Cuadro 14. Programa de reacción para la PCR en tiempo real	46
Cuadro 15. Condiciones de reacción para la RT ensayo in vivo	53
Cuadro 16. Programa de reacción para la RT ensayo in vivo	54
Cuadro 17. Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real	54
Cuadro 18. Programa de reacción para la PCR en tiempo real	55
Cuadro 19. Condiciones de reacción para la PCR1 del genotipo	57
Cuadro 20. Programa de reacción para la PCR1 del genotipo	58
Cuadro 21. Condiciones de reacción para la PCR2 del genotipo	58
Cuadro 22. Programa de reacción para la PCR2 del genotipo	59

ABREVIATURAS

aa.- Aminoácidos.

AAS.- Ácido acetil salicílico

ADN.- Ácido desoxiribonucleico.

ARN.- Ácido ribonucleico.

ARNdc.- ARN de doble cadena.

ARNm.- ARN mensajero.

ARNss.- ARN de cadena sencilla.

ATP.- Adenosín trifosfato.

Ca⁺².- Calcio.

CaCl.- Cloruro de Calcio.

Da.- Daltones.

DEPC.- Dietilpirocarbonato.

dNTP's.- Desoxinucleótidos trifosfato.

EDTA.- Ácido etilen-diamino-tetracético.

ELISA.- Ensayo Inmunoenzimático.

g.- Gramos.

H₂O.- Agua.

HCl.- Ácido Clorhídrico.

IP₃.- Inositol 1,4,5 trifosfato.

kDa.- KiloDaltons.

KCl.- Cloruro de Potasio.

K_2HPO_4 .- Bifosfato de Potasio.

MAbs.- Anticuerpos monoclonales.

Mg^{+2} .- Magnesio.

MPM.- Marcador de Peso Molecular.

μL .- Microlitro.

μM .- Micromolar.

μg .- Microgramo.

Min.- Minutos.

mL.- Mililitro.

mM.- Milimolar.

mm.- Milímetros.

$MgCl_2$.- Cloruro de Magnesio.

Ng.- Nanogramos.

Nt.- Nucleótidos.

NaCl.- Cloruro de Sodio.

NaOH.-Hidróxido de Sodio.

NDP.- Nucleotidil difosfato.

NSP.- Proteína no estructural.

NTP.- Nucleotidil trifosfato.

$^{\circ}C$.- Grados centígrados.

PAGE.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

Pb.- Pares de bases.

PBS.- Solución de Buffer Fosfatos.

PCR.- Reacción en Cadena de la Polimerasa.

pH.- Potencial de Hidrógeno.

Rpm.- Revoluciones por minuto.

RT.- Transcriptasa Reversa.

s.- Segundos.

SA.- Ácido sálico.

SDS.- Duodecyl sulfato de sodio.

Taq.- *Termofilus aquaticus*.

TBE.- Tris-Borato-EDTA.

TE.- Tris-EDTA

TEMED.- N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamina.

UV.- Ultravioleta.

V.- Volts.

VHC. Virus de la hepatitis C

%.- Por ciento.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS EN LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Introducción: La infección por el virus de la Hepatitis C (VHC) es un problema de salud a nivel mundial afectando a más de 170 millones de personas. Actualmente el único tratamiento disponible es interferón alfa (INF- α) más ribavirina, respondiendo sólo el ~50% de los pacientes. Debido a esto se necesitan alternativas en el tratamiento para pacientes no respondedores. Se ha reportado que la Aspirina (AAS) disminuye los niveles del RNA de VHC. La AAS pertenece a la familia de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), los cuales son inhibidores de las ciclooxigenasas (COX). Sin embargo no se conoce bajo que mecanismo la AAS reduce los niveles de RNA viral, debido y si esta propiedad antiviral es característica de otros AINES.

Objetivo: Evaluar el efecto del Diclofenaco, Indometacina y Salicilato de Sodio en la replicación y expresión génica, en el modelo de replicones subgenómicos del VHC.; así como realizar un estudio clínico exploratorio para evaluar el efecto de la aspirina y el diclofenaco en la carga viral de pacientes con VHC.

Materiales y Métodos: Se utilizó la línea celular de hepatocitos humanos Huh-7 que expresan establemente las proteínas no estructurales del VHC. Las células fueron incubadas en ausencia o en presencia de las siguientes concentraciones: (50-200 μ M) de Diclofenaco, (50-200 μ M) de Indometacina y (2-8 mM) de Salicilato de Sodio e incubadas por 24, 48 y 72 horas. Para evaluar la citotoxicidad se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para determinar los niveles de RNA se realizó PCR en tiempo real para VHC y GAPDH; y para cuantificar los niveles de proteínas se realizaron ensayos de western blot para las proteínas celulares COX-2, actina y para la proteína viral NPT-II. Para el estudio clínico exploratorio ingresaron pacientes con hepatitis C crónica, los cuales se dividieron al azar en tres esquemas de tratamiento : Grupo A (Aspirina + INF-PEG α + RBV), Grupo B (DCF + INF-PEG α + RBV) y como control el Grupo C (INF-PEG α + RBV), las concentraciones se determinaron en base al peso de los pacientes. Se evaluó la carga viral por medio de PCR en tiempo real, se cuantificaron los marcadores de estres oxidativo (SOD, Gpx, TBARS) ; para evaluar los efectos adversos se les realizó un cuestionario así como determinación de transaminasas y biometría hemática.

Resultados: El diclofenaco la indometacina y el salicilato de sodio disminuyeron los niveles de RNA viral hasta en un 45%, 59% y 64%, respectivamente. Siendo este efecto más evidente a las 24 horas postratamiento. El diclofenaco aumento los niveles de la proteína NPT-II así como los niveles de COX-2 a las 24 y 48 h postratamiento. La indometacina aumentó los niveles II y COX-2 a los tres tiempos. En la paciente AAS-1 la aspirina como monoterapia disminuyó la carga viral en un 70.49% y en combinación con la terapia estándar en un 73.02%, el tratamiento con aspirina disminuyó la actividad de Gpx y TBARS y aumentó la actividad de SOD. En las pacientes DCF-1 y DCF-2 el diclofenaco como monoterapia disminuyó la carga viral en un 14.15% y 36.15%, respectivamente, en ambos pacientes se presentó un efecto sinérgico al combinar el diclofenaco con la terapia estándar al disminuir la carga viral en un 92.32% y 90.75%, respectivamente. En la paciente DCF-1 la actividad de SOD y Gpx aumentó al igual que los niveles de TBARS; para la paciente DCF-2 la actividad de SOD y los niveles de TBARS permanecieron constantes y hubo una ligera disminución en la actividad de Gpx.

Conclusiones: Los AINES evaluados en este estudio in vitro disminuyeron la carga viral de VHC probablemente por mecanismos diferentes. La aspirina mostró un efecto antiviral y antioxidante. El diclofenaco mostro un efecto antiviral en los pacientes evento que también se observó in vitro; así como mostró un efecto sinérgico al combinarse con la terapia estándar.

I. INTRODUCCIÓN

La hepatitis es una enfermedad inflamatoria y necrosante del hígado, la cual puede presentarse de manera aguda (infección por un período corto) o de manera crónica (infección persistente). Esta enfermedad puede ser causada por: exposición a ciertas drogas, químicos, reacciones inmunológicas, además de agentes infecciosos como: virus y bacterias.

Se han identificado un gran número de virus que infectan el hígado denominados virus de la hepatitis, los cuales se clasifican de acuerdo a sus variaciones antigénicas en: A, B, C, D, E y G⁴.

1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HEPATITIS C

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la prevalencia global de la infección por VHC es del 3%, lo que corresponde a 170 millones de personas⁵. Sin embargo los patrones de infección por VHC varían de acuerdo a regiones geográficas, por ejemplo la prevalencia más baja de infección la poseen países como Reino Unido y Escandinava (0.01-0.1%) y la prevalencia más alta la reportó Egipto con un estimado del 15-20% (Figura 1)⁵.

Determinar la incidencia de infección por VHC es difícil debido a que la mayoría de las infecciones son asintomáticas y los ensayos disponibles no distinguen entre una infección aguda y crónica o una infección resuelta (personas que eliminaron la infección). Pero se estima que alrededor de 3-4 millones de personas se infectan cada año con este virus. Por lo que representa un problema de salud de gran importancia médica en todo el mundo⁵.

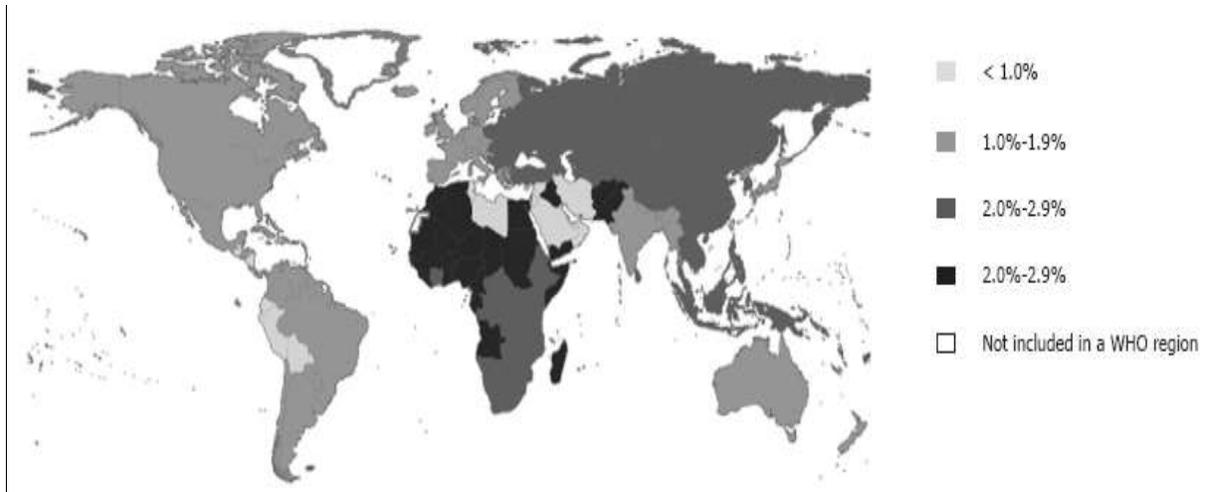


Figura 1: Prevalencia de la infección por VHC en las distintas regiones geográficas².

1.1.2 Prevalencia en México

En México las enfermedades crónicas del hígado representan la cuarta causa de muerte⁶. El alcohol, el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC) son las principales causas de cirrosis en nuestro país⁶.

La prevalencia del virus de la hepatitis C en nuestro país varía considerablemente de acuerdo a la región: en Durango se ha reportado una prevalencia del 1.47%, en Monterrey del 0.47% y en México de 0.77%⁷. Se calcula que en México se encuentran infectados con este virus de 700,000- 1.2 millones de personas⁸.

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

El VHC es un virus envuelto de 40-65 nm, es el único miembro del género Hepacivirus el cual se encuentra dentro de la familia *Flaviviridae*, en la cual también se encuentran el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla⁹. Su genoma es una molécula de RNA de polaridad positiva de una longitud de aproximadamente 9600 nt, flanqueado por regiones 5' y 3' no codificantes (UTRs) (Figura 2).

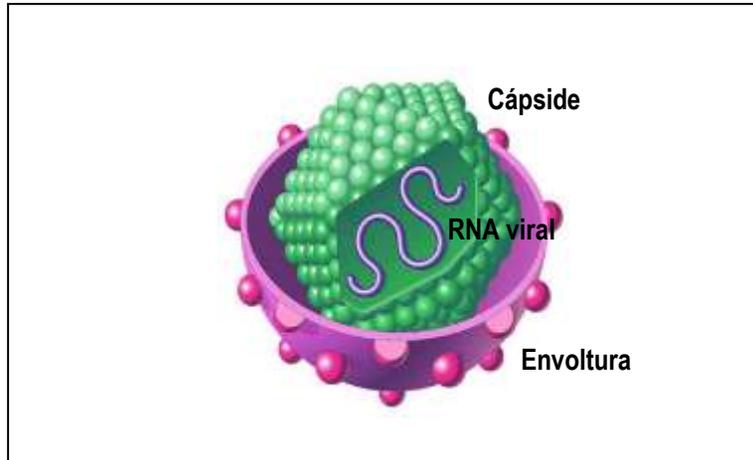


Figura 2: Partícula viral

Posee un solo marco abierto de lectura (ORF), lo que da lugar a una poliproteína de aproximadamente 3100 aminoácidos la cual es procesada tanto por proteasas virales como celulares para dar lugar a 4 proteínas estructurales y 6 proteínas no estructurales (NS) (Figura 3)³.

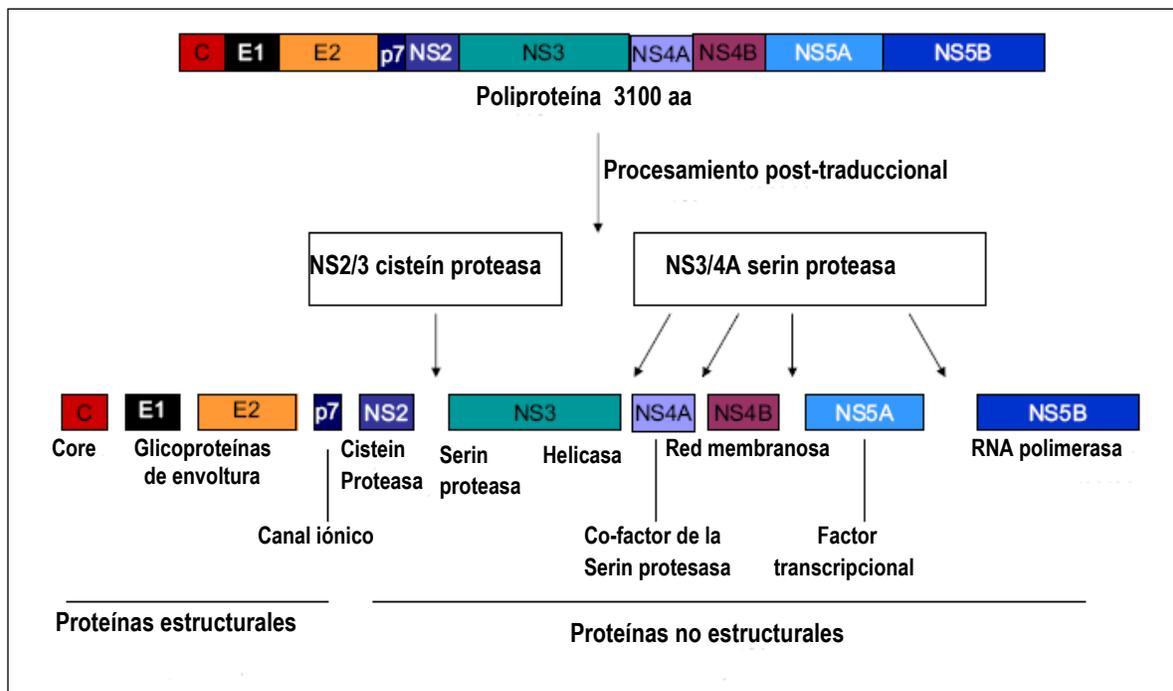


Figura 3: Procesamiento de la poliproteína del VHC. Las flechas indican los sitios de corte para las proteasas virales⁷.

1.2.1 Proteínas Virales del VHC

Las proteínas estructurales virales son: la proteína del core la cual es la más abundante de la nucleocápside; las proteínas de envoltura (E1 y E2), las cuales están glicosiladas; el péptido corto p7, el cual se cree que es una viroporina, responsable de la permeabilidad y secreción de la membrana⁷.

Las proteínas no estructurales muchas de ellas participan en actividades proteolíticas (NS2, NS3 y NS4A), la proteína NS4B forma un complejo de replicación y la proteína NS5B es la RNA polimerasa dependiente de RNA (Cuadro 1)⁷.

Proteína o región del VHC.	Función
5' -UTR	Contiene la región IRES necesaria para la traducción de la poliproteína
Core	Nucleocápside, morfogénesis viral, unión al RNA y replicación, asociación con vacuolas lipídicas
E1/E2	Envoltura, unión a receptor, entrada a la célula, y resistencia a INF?
p7	Canal iónico potencialmente involucrado en la infección viral
NS2	Forma con NS3 una cistein proteasa dimérica, procesamiento de la poliproteína
NS3	NS2/3 cistein proteasa, NS3/4A serin proteasa, helicasa, inhibición de la respuesta inmune innata, parte del complejo de RNA viral, nucleotidin
NS4A	Cofactor de la serin proteasa, aumenta la actividad proteolítica de la NS3.
NS4B	Proteína de membrana localizada en el RE, forma una red membranosa que contiene el complejo de replicación
NS5A	Resistencia a INF, replicación de RNA, modulación de las vías celulares (crecimiento celular, apoptosis, etc.)
NS5B	RNA polimerasa dependiente de RNA
3'-UTR	RNA replicación, estimula la traducción IRES-dependiente.

Cuadro 1: Funciones de las proteínas y regiones no codificantes del VHC ⁷.

1.2.2 Replicación viral del VHC

El virus se replica principalmente en los hepatocitos, las proteínas de envoltura E1 y E2 son esenciales para la entrada del virus a la célula e interaccionan con los receptores celulares incluyendo la tetraspanina CD81, el receptor "scavenger" clase B tipo I (SR-BI), el heparan sulfato (HS), los receptores DC-SIGN/L-SIGN, el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) y claudina⁷. Una vez que las partículas virales interaccionan con los receptores se cree que probablemente haya una internalización del virus mediante fusión de membranas, lo que conlleva a la liberación del RNA (+) dentro del citoplasma de la célula infectada.

Este genoma sirve como RNAm (el cual carece del 5' cap y la cadena 3' de poli A), este es traducido para producir las proteínas virales, la traducción del genoma de VHC depende del IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), ya que este se une a la subunidad 40s ribosomal, una vez unidos reclutan al factor eucariótico de inicio de la transcripción 3 (eIF3) y al complejo Met-tRNA-eIF2-GTP, esto conlleva a la formación del complejo activo 80s.

Una vez iniciada la traducción el genoma de VHC, se produce una poliproteína la cual esta estrechamente asociada a la membrana del retículo endoplásmico (RE), esta es procesada por proteasas virales y celulares para dar lugar a las 10 proteínas virales. Al mismo tiempo a partir de la hebra positiva se genera la hebra negativa, la replicación del RNA en asociación de membranas citoplasmáticas alteradas, las proteínas NS, el RNA y la proteína NS5B se asocian para formar una estructura vesicular formando una red membranosa inducida por NS4B.

Finalmente la hebra positiva interactúa con las proteínas estructurales y no estructurales recién sintetizadas para ensamblar nuevas partículas virales, que son transportadas desde el retículo endoplásmico, pasando por el aparato de golgi, para finalmente ser exportadas fuera de la célula y comenzar un nuevo ciclo al infectar a otra célula (Figura 4)^{7, 10}.

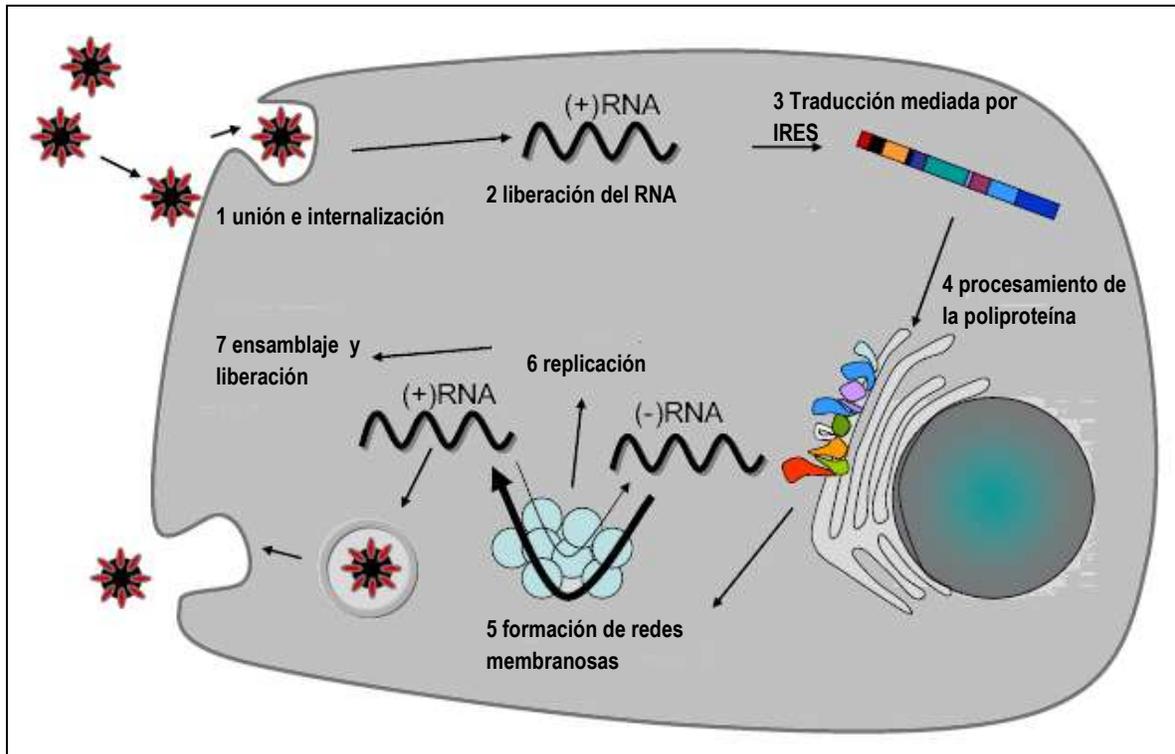


Figura 4: Ciclo de replicación del VHC⁷.

1.2.3 Clasificación del VHC.

Al comparar la secuencia nucleotídica de las variantes recuperadas de sujetos infectados en diferentes grupos de riesgo y en distintas regiones geográficas han revelado la existencia de al menos seis genotipos (del 1 al 6), los cuales difieren en su secuencia en un 30-35% siendo las regiones más variables las glicoproteínas de membrana E1 y E2, mientras que las regiones del core y NS3 son las más conservadas. La secuencia que presenta una tasa menor de variabilidad es la región 5' UTR¹¹. Cada uno de los seis genotipos se divide en alrededor de 40 subtipos (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j y k) los cuales están más relacionados en su secuencia ya que entre ellos varían en un 20-25%^{9, 12}. La frecuencia de los genotipos varía de un área geográfica a otra. En Norteamérica y Europa Occidental se han reportado los genotipos: 1a, 1b, 2a/2c y 2b (Figura 5); en México se han reportado los genotipos 1a, 1b, 2a/2c, 2b y 3a, siendo el genotipo 1b el que predomina en un 70% de los casos¹³.

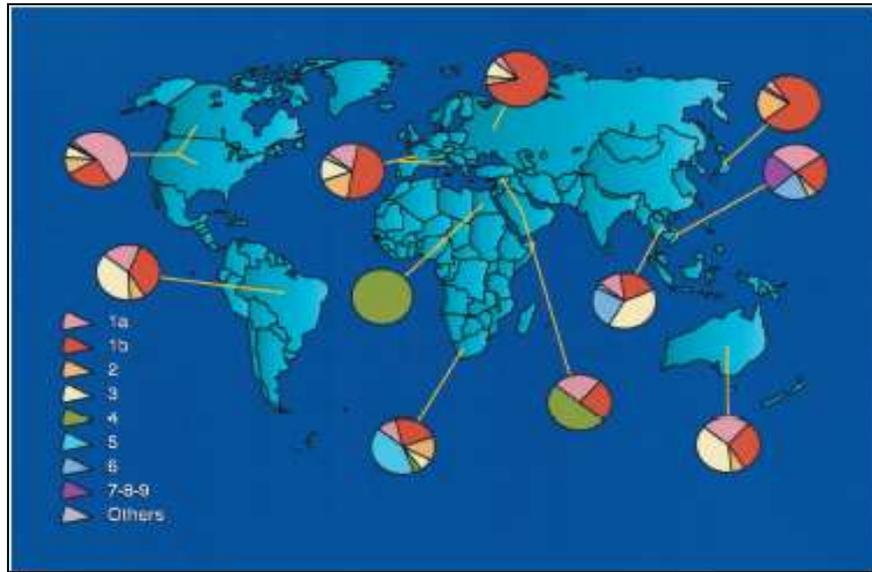


Figura 5: Distribución de los genotipos del VHC en las distintas regiones geográficas¹⁰.

El VHC también varía dentro de un individuo infectado a lo largo del tiempo formando las conocidas cuasiespecies. La variabilidad genética preexistente, combinada con una población extremadamente grande de estirpes virales en un paciente infectado crónicamente, provee un amplio rango de variantes que pueden adaptarse a nuevas presiones selectivas, tales como reconocimiento inmunológico y terapia antiviral⁹. La co-infección no es común debido a mecanismos de interferencia entre dos genotipos, aunque si se han reportado co-infecciones con diferentes genotipos del VHC, la mayoría de los pacientes coinfectados fueron con genotipos 1a y 1b, aunque también se han reportado coinfecciones con genotipo 1b mas 2a/c o 2a/c mas 2b¹⁰.

1.3 VIAS DE TRANSMISIÓN

La manera más eficiente de transmitir el VHC es a través de largas y repetidas exposiciones percutáneas de sangres como por ejemplo: transfusión o trasplante por un donador infectado así como la utilización de drogas intravenosas. Y el virus es menos eficiente para transmitirse por pequeñas dosis de exposiciones percutáneas como por ejemplo: accidentes con punzocortantes; así como también se ha visto un bajo porcentaje de infección por exposición por mucosas o hemoderivados como: nacimiento de una madre infectada o sexo con una persona VHC positiva⁴ (Cuadro 2).

Factor de Riesgo	Bajo	Moderado	Alto
Drogas IV	++++	++	+
Transfusión	+++	+++	+++
Punzocortantes	+	++++	++++
Ocupacional	+	+	+
Perinatal	+	+	+
Sexo de alto riesgo	++	+	+/-

Cuadro 2: Importancia de los diferentes factores de riesgo para la transmisión de VHC. En la figura se muestran patrones de alto, moderado y bajo riesgo de acuerdo a los niveles de infección a nivel mundial¹.

1.6 ESPECTRO CLINICO DE LA HEPATITIS C

La infección por el VHC puede dar lugar a cuadros clínicos muy diversos y de muy distinta gravedad, que van desde las formas asintomáticas de hepatitis aguda autolimitada o de hepatitis crónica hasta formas graves de hepatopatía crónica, como la cirrosis hepática descompensada y el carcinoma hepatocelular, con todas sus complicaciones. Además, la infección crónica por el VHC se asocia con cierta frecuencia a una larga serie de manifestaciones extrahepáticas, en muchas de las cuales intervienen mecanismos patogénicos de naturaleza autoinmune¹².

1.6.1 Hepatitis Aguda

Los pacientes infectados por VHC cursan por una hepatitis aguda, la mayoría de los casos son asintomáticos^{14,15}. En caso de que la infección aguda presente síntomas, el período de incubación puede variar entre 2 y 26 semanas después de la exposición al agente viral, las manifestaciones clínicas más frecuentes son las siguientes: astenia, molestias digestivas inespecíficas, ictericia, coluria, náusea y malestar^{12,13,14}.

La elevación de las transaminasas es la alteración bioquímica más característica, es frecuente que presenten fluctuaciones marcadas desde valores normales o casi normales hasta picos de 20 o más veces por encima de los valores normales. El diagnóstico se

basa en la identificación del ARN viral en suero (que puede detectarse durante en el período de incubación), aunque en algunos casos este puede dar negativo¹³.

1.6.2 Hepatitis C crónica

La hepatitis C crónica es el resultado de la persistencia de la infección por el VHC durante largos períodos de tiempo, se caracteriza por la presencia del RNA viral en sangre por mas de 6 meses, y se calcula que alrededor del 75-85% de los pacientes con infección aguda progresan a la cronicidad (Figura 6)¹³.

La presencia del virus en los hepatocitos, en cuyo interior se replica de forma persistente, da lugar a una reacción inmunitaria que determina la aparición en el hígado de inflamación y necrosis celular crónicas, que se mantienen durante muchos años. No se conoce cuál es el mecanismo íntimo que interviene en la inmunopatogenia de estas lesiones y es posible que, además, el VHC pueda causar daño hepático por ser directamente citopático. La intensidad de estas alteraciones histopatológicas y su capacidad para generar lesiones hepáticas graves e irreversibles varía muy notablemente de unos pacientes a otros, pero tampoco se conoce con certeza por qué razones la evolución difiere de unos pacientes a otros^{12,13}.

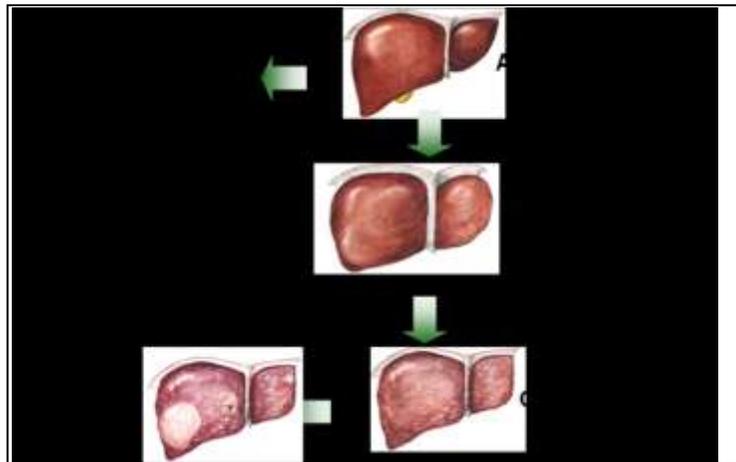


Figura 6: Progresión de la hepatitis C. Porcentaje de pacientes que desarrollan cada una de las etapas de la infección por VHC.¹²

Sin embargo se ha visto que hay ciertos factores que predisponen para el desarrollo de una hepatitis crónica de entre los cuales están: Inmunosupresión, género masculino, coinfectado con VIH, que no se presentan síntomas durante la infección aguda, raza afro-

americana así como ser mayor de 25 años, no existen pruebas de que el genotipo del virus guarde relación con la evolución de la infección, pero algunos datos sugieren que la inoculación con una mayor cantidad de viriones¹³. La cronificación se caracteriza por la persistencia de valores elevados de transaminasas, usualmente a cifras más bajas que en la fase aguda inicial, junto con persistencia del RNA-VHC sérico. En algunos pacientes, las transaminasas se normalizan durante largos períodos de tiempo, pero el RNA-VHC se mantiene positivo, lo que indica que la infección persiste. No es infrecuente que la normalización de transaminasas y la negativización del RNA-VHC aparezcan de forma transitoria en pacientes que más tarde desarrollan una infección crónica, lo que hace obligatorio el examen repetido de estos marcadores para el buen control de estos enfermos¹².

1.6.3 Fibrosis

La hepatitis C crónica se caracteriza por una lenta progresión a la fibrosis hepática sobre todo en pacientes con una viremia persistente.^{13,16} La fibrosis se define como el desarrollo de tejido cicatrizado fibroso dentro del hígado y aparece cuando los procesos normales de reparación de tejidos quedan fuera de control, se caracteriza por la acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular principalmente colágeno tipo IV y tipo I^{17, 18}, las principales células encargadas de la producción de colágeno en el hígado son las células estelares, los fibroblastos portales y los miofibroblastos.

La fibrosis hepática es el resultado de la activación de un proceso de sanación que es activado cuando hay un daño hepático (hepatitis viral), las células del parénquima se regeneran y reemplazan las células necróticas y apoptóticas del hígado. Este proceso esta asociado con la respuesta inflamatoria y con el deposito de proteínas de matriz extracelular (MEC), si el daño hepático persiste los procesos de regeneración hepática fallan y los hepatocitos son sustituidos por abundantes proteínas de MEC, la cual comienza alrededor del tracto portal (Figura 7). La fibrosis esta asociada con una alteración tanto en la cantidad como en la composición de MEC, en estadios avanzados el hígado acumula más de 6 veces MEC que lo normal.

Las proteínas de MEC son colágenos (I, III y IV), fibronectina, undilina, elastina, laminina, hialuronidasa y proteoglicanos¹⁶.

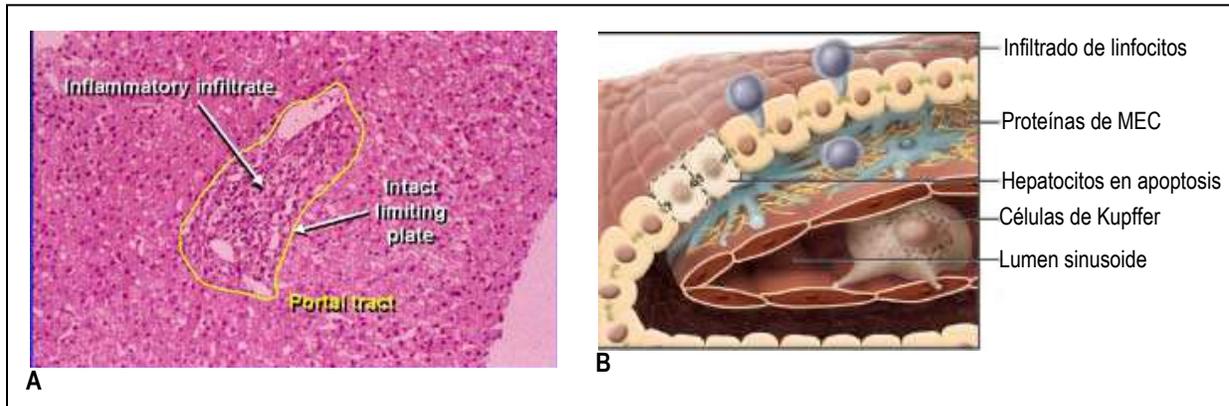


Figura 7: A) Biopsia hepática de un paciente con fibrosis de etiología viral, la delimitación en amarillo muestra la triada portal la cual esta formada por una vena, una arteria y un conductillo biliar; se puede observar que existe un infiltrado de linfocitos (puntos en color púrpura) característico. B) Representación de la patogénesis de la fibrosis hepática: ocurre un infiltrado de linfocitos en el parénquima, algunos hepatocitos sufren apoptosis y activan a las células de Kupffer que liberan mediadores de la fibrogenesis. Las células estelares proliferan y secretan proteínas de MEC¹⁵.

1.6.4 Cirrosis

La cirrosis es un diagnóstico histológico que se basa en tres criterios esenciales: que es una enfermedad difusa, la presencia de fibrosis y la formación de nódulos (Figura 8). En estadios avanzados de fibrosis las proteínas de MEC se hacen más densas y se agrupan en islotes de hepatocitos, formando nódulos, los cuales impiden la irrigación sanguínea y por consiguiente causan necrosis celular¹⁷. La progresión a la cirrosis ocurre aproximadamente en el 20-25% de los pacientes con fibrosis y esta se desarrolla por lo general después de 10 años de padecer la enfermedad. La transición a la cirrosis en pacientes VHC positivos por lo general carece de manifestaciones clínicas^{13, 19}. Sin embargo algunos pacientes reportan: fatiga, náusea, malasia, anorexia, pérdida de peso y reducción de la libido. Las complicaciones más severas se presentan en pacientes con una cirrosis descompensada, la cual se presenta cuando la enfermedad esta muy avanzada dentro de los síntomas están: edema, fatiga, ascitis, poca concentración y pérdida de la memoria, y dentro de las complicaciones se encuentran: peritonitis bacteriana espontánea, hipertensión portal, encefalopatía, síndrome hepatorenal, varices y cáncer de hígado.

Los estudios que han analizado la evolución a largo plazo de los enfermos con cirrosis compensada han mostrado, tras cinco años de seguimiento, la aparición de manifestaciones de descompensación en el 18% y el desarrollo de un hepatocarcinoma

en el 7%, así como una mortalidad acumulada del 9%, debido a complicaciones de la enfermedad hepática^{17, 20}.

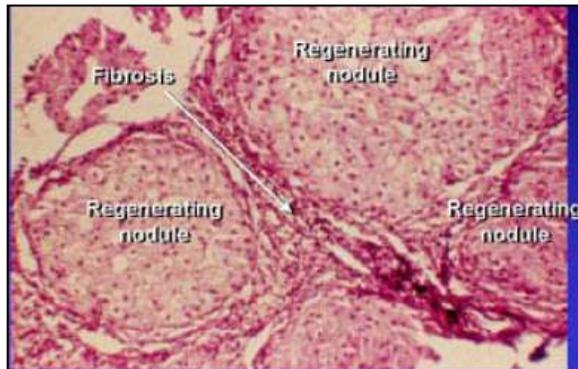


Figura 8: Biopsia hepática de un paciente con cirrosis de etiología viral, se puede observar la formación de nódulos.

1.6.5 Carcinoma Hepatocelular

El carcinoma hepatocelular se desarrolla del 1-5% de los pacientes con cirrosis. El CHC es uno de los tumores más malignos y representa el quinto cáncer más frecuente en el mundo, actualmente se conoce que el 70% de los pacientes con CHC están infectados con VHC²¹. El factor que se asocia más estrechamente a la aparición de carcinoma hepatocelular en pacientes con hepatitis C crónica es la existencia de cirrosis, de tal manera que es excepcional la aparición de este tumor en pacientes sin cirrosis. La edad superior a 55 años, el sexo masculino y la presencia de valores elevados de alfa-fetoproteína son los factores que se asocian más estrechamente a la aparición de este cáncer en los pacientes con cirrosis compensada por VHC^{19, 22}.

En la biopsia hepática se detecta la formación de pequeños nódulos que poseen un tamaño de 1-2 cm y pueden estar encapsulados en una cápsula fibrosa. El tumor es clínicamente indolente durante la fase temprana, mientras que en fase tardía se presenta hepatomegalia, un dolor intenso abdominal e ictericia²⁰.

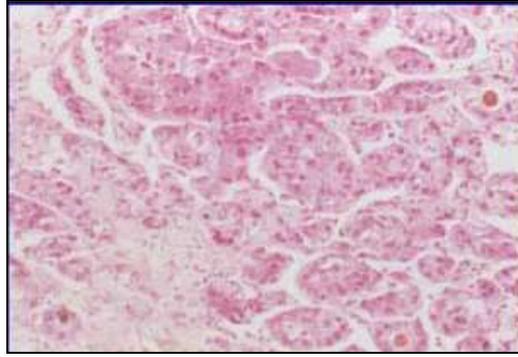


Figura 9: Biopsia hepática de un paciente con carcinoma hepatocelular (CHC) de etiología viral, se pueden observar la presencia de nódulos dispersos encapsulados por una septa fibrótica.

1.7 Diagnóstico

El uso de pruebas serológicas y virales son esenciales para el manejo de la infección por VHC ya sea para el diagnóstico, decisiones en el tratamiento o respuesta a la terapia antiviral²³. El monitoreo de la enfermedad se realiza en donadores, personas de alto riesgo (drogadictos, VIH positivos, pacientes con transfusiones antes de 1992, etc.), pacientes que presentaron durante el examen clínico ictericia, o en pacientes que presentaron niveles elevados de transaminasas²⁴.

1.7.1 Pruebas hepáticas no específicas

1.7.1.1 Niveles de transaminasas en Suero.

Las transaminasas hepáticas como la alanino transaminasa (ALT) y la aspartato transaminasa (AST) son parte de los paneles de laboratorio de rutina. Los valores normales son: para la ALT los valores oscilan de 13 a 42 para mujeres y de 13 a 61 para hombres; para la AST los valores van de 8 a 39 en mujeres y de 14 a 50 en hombres. Existen varios factores que aumentan los niveles de las transaminasas en pacientes sanos como el peso, la edad y el ejercicio. Es por eso que un valor elevado de estas enzimas no es relevante, es necesario repetir la prueba 6 meses después para confirmar un valor anormal²⁵. La ALT y AST son dos de los marcadores de daño hepático o necrosis y se elevan en un sin número de patologías, ambas enzimas se encuentran en citosol por lo que un aumento en suero indica necrosis celular. Sin embargo no son específicas de hígado ya que también se encuentran en páncreas, corazón, riñón, cerebro, musculo

esquelético, pulmón, páncreas y células sanguíneas. En daño hepático las enzimas superan los valores normales hasta 2000 UI/ml, sin embargo el 30% de los pacientes con VHC presentan valores normales. No son pruebas específicas, no son un valor pronóstico y no se utilizan para monitorear respuesta a la terapia, por lo tanto se necesitan realizar más pruebas para dar un diagnóstico²⁶.

1.7.1.2 Biopsia Hepática

La biopsia hepática aporta información sobre el nivel de fibrosis y el grado de inflamación hepática, aspectos histológicos que son útiles para predecir la historia natural de la enfermedad y la progresión de la misma. La biopsia hepática debe ser de al menos de 15 mm a 20 mm de longitud y de 1.4 mm de ancho²⁷. Existen varios sistemas de valoración para definir la intensidad de inflamación (grados), el sistema de evaluación Metavir y el sistema de grados de Ishak son los más utilizados^{28, 29}.

Grado de fibrosis	Metavir	Ishak
Ninguno	0	0
Expansión de fibrosa de algunas áreas portales	1	1
Expansión fibrosa de la mayoría de las áreas portales	1	2
Expansión fibrosa de la mayoría de las áreas portales con puentes ocasionales porta a porta.	2	3
Expansión fibrosa de la mayoría de las áreas portales con puentes marcados.	3	4
Puentes marcados con nódulos ocasionales (cirrosis incompleta)	3	5
Cirrosis probable o definitiva	4	6

Cuadro 3: Escalas para medir la fibrosis en una biopsia hepática.

1.7.2 Fibrotest

Actualmente existe una prueba para determinar el grado de fibrosis el cual se basa en la medición de vario parámetros de laboratorio y a diferencia de la biopsia hepática no es invasiva por lo tanto no le causa ningún dolor al paciente y sobre todo no se pone en

riesgo su salud. La biopsia hepática ha sido el estándar de oro para determinar el grado de fibrosis debido a que es un método directo.

Sin embargo es invasivo, estresante para los pacientes y es sujeto a error, debido a que se puede tomar una región del hígado sin daño histológico y dar un diagnóstico equivocado. El Fibrotest combina cinco marcadores bioquímicos indirectos de fibrosis ajustados a la edad y el sexo, los cuales se asocian con activación de las células estelares y por ende se determina el grado de daño hepático (Cuadro 4).

Marcador serológico	Función
Alfa 2 macroglobulina	Inhibe la actividad de colagenasa, aumentando así la fibrosis de la MEC
Haptoglobina	Aumenta la actividad de colagenasa disminuyendo la fibrosis
Apolipoproteína A1	Transporta el colesterol en el hígado. La MEC y el colágeno disminuyen su producción a medida que avanza la fibrosis.
Bilirrubina	Pigmento de la degradación de hemoglobina que es producido en el hígado y este aumenta conforme progresa la fibrosis
Gamma glutamil transferasa	Enzima hepática que aumenta con la fibrosis

Cuadro 4: Marcadores serológicos utilizados por el Fibrotest para determinar el grado de fibrosis.

El método estadístico que se utiliza para estimar el valor diagnóstico de los marcadores de fibrosis es el AUROC (Area Under the Receiving Operator Curve), el cual establece un índice comparable con la biopsia hepática (Cuadro 5).

FibroTest	Metavir	Ishak
0.75 - 1.00	F4	F6
0.73 - 0.74	F3-F4	F5
0.59 - 0.72	F3	F4
0.49 - 0.58	F1-F3	F3
0.32 - 0.48	F1-F3	F2-F3
0.28-0.31	F1	F2
0.22-0.27	F0-F1	F1
0.00-0.21	F0	F0

Cuadro 5: Conversión del rango del Fibrotest al estado de fibrosis

1.7.3 Pruebas virológicas

1.7.3.1 Análisis serológicos

El inmunoensayo (ELISA) es la prueba inicial para el diagnóstico de VHC utilizando inmunoglobulinas G (IgG). La primera generación de inmunoensayos utilizaban el epítipo c100-3 de la proteína NS4, la sensibilidad de estos era de aproximadamente 80%, sin embargo existía una fracción considerable de falsos positivos, esto conllevó al desarrollo de métodos más sensibles y específicos generándose el inmunoensayo ELISA de segunda generación que fue aprobada en 1992 por la FDA (Food and Drug Administration), la cual incorporó antígenos adicionales de proteínas NS (c33c) y de proteínas estructurales (c22-3). Estos ensayos eran 10% más efectivos que los ensayos de primera generación y detectaban la infección de 30 a 90 días antes, su sensibilidad era el 95%. En 1996 la FDA aprobó los inmunoensayos de tercera generación, los cuales poseen un antígeno adicional (NS5) detectando anticuerpos 26 días antes que los inmunoensayos de segunda generación y su sensibilidad es del 99%. Se deben realizar otras pruebas para confirmar el diagnóstico (detección de RNA viral), ya que no distinguen entre un paciente infectado y un paciente que eliminó la enfermedad, así como una infección crónica o aguda^{24, 30}.

1.7.2.2 VHC RIBA (recombinant immunoblot assay)

Es una prueba adicional para confirmar la presencia de anticuerpos del VHC por ELISA, creada por la compañía Chiron (Emeryville, California) con la finalidad de determinar los falsos positivos, el RIBA de tercera generación fue aprobado por la FDA en 1999. Este inmunoensayo de tira incluye antígenos utilizados en la ELISA y superóxido dismutasa humana (hSOD). Los antígenos recombinantes c33c y NS5 los fusionaron con la proteína hSOD, esta proteína recombinante es utilizada para la detección de anticuerpos no específicos²². Esta prueba posee una sensibilidad del 97%, sin embargo no diferencia entre una infección aguda, crónica y resuelta. La prueba de RIBA se realiza como un diagnóstico confirmatorio en pacientes con bajo riesgo o en pacientes con alto riesgo RNA-VHC negativos^{22, 28}.

1.7.2.3 Detección del RNA de VHC

La presencia del RNA viral en plasma define la actividad de la infección el cual puede ser detectado a partir de la 1 o 3 semana de exposición²². La organización mundial de la salud (OMS) ha establecido una unidad universal para estandarizar la cuantificación del RNA viral. Las unidades internacionales (UI) se han definido como las unidades para la cuantificación del VHC²¹.

La detección cualitativa del RNA viral se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El RNA viral es extraído y se realiza la transcripción inversa (RT) el cual es sometido a una reacción enzimática para generar múltiples copias. Los ensayos comerciales detectan al menos 50 UI/ml y poseen una sensibilidad equitativa para cada uno de los genotipos. El límite de detección para el Amplicor® HCV v2.0 o su versión semiautomática Cobas® Amplicor HCV v2.0 (Roche) es de 50 UI/ml, mientras que el TMA (transcription mediated assay) Versant® (Bayer) detecta hasta 10 UI/ml. Los ensayos que se basan en PCR en tiempo real (Cobas Taqman de Roche) detectan menos de 15 UI/ml pero solo de manera cualitativa.

Para los ensayos cuantitativos se basan en técnicas de amplificación. En el mercado se encuentran varios ensayos disponibles (Cuadro 6)^{28,31}.

Ensayo	Marca	Técnica	Rango de detección
Amplicor HCV monitor® v2.0	Roche	RT-PCR manual	600-500,000 UI/ml
Cobas® Amplicor HCV monitor v2.0	Roche	RT-PCR semiautomática	600-500,000 UI/ml
LCx HCV RNA quantitative assay	Abbott diagnostic	RT-PCR semiautomática	25-2, 630, 000 UI/ml
Versant® HCV RNA 3.0 assay	Bayer	bDNA semiautomática	615-7,700,000 UI/ml
Cobas® Taqman HCV test	Roche	PCR tiempo real semiautomática	43- 69,000,000 UI/ml
Abbott Real time	Abbott diagnostic	PCR tiempo real semiautomática	12-100,000,000 UI/ml

Cuadro 6: Ensayos comerciales cuantitativos para VHC

1.8 Tratamiento para la Hepatitis C

La terapia actual para hepatitis C crónica es una combinación de interferón alfa (INF- α) y ribavirina. La cual es recomendada para adultos con hepatitis C crónica que poseen niveles detectables de RNA en suero, elevación en los niveles de aminotransferasas, evidencia histológica de una enfermedad del hígado progresiva, y que el paciente no posea contraindicaciones³².

1.8.1 Mecanismo de acción del interferón

Los interferones son glicoproteínas producidas por las células de la mayoría de los vertebrados en respuesta a un agente extraño como: virus, bacterias, hongos y parásito; así como células tumorales. Los INF son producidos por células de la respuesta inmune innata y adaptativa y por células no-inmunes como fibroblastos y células epiteliales. Los interferones se clasifican en tipos de acuerdo al receptor con el cual interactúan, los INF de tipo I (al cual pertenece el INF- α) se unen a un receptor específico que está compuesto por dos subunidades, el cual se denomina receptor de interferón alfa (INFAR).

La mayoría de las células reconocen a los RNA y DNA virus, mediante la presencia de dsRNA (RNA de doble cadena) intracelulares generados durante la replicación o la transcripción. Los patrones moleculares conservados de los dsRNA son reconocidos por los receptores PRR (pattern-recognition receptors), de los cuales los más conocidos son los TLR (Toll-like receptors), el gen 1 inducido por ácido retinoico (RIG-1) y los receptores RLR (like helicase receptors). Los TLR se encuentran en la superficie celular, mientras que los RLR son expresados en el citoplasma, su activación conlleva a la producción de INF. El INF producido se une a su receptor (el cual se encuentra en la mayoría de las células), el cual es un heterodímero compuesto por una cadena α (INFAR-1) y por una cadena β (INFAR-2); estas subunidades se expresan de manera igual en la mayoría de las células y están asociados a dos cinasas la Jak1 (Janus activated kinase) y la Tyk2 (tirosin cinasa) ambos localizados en el lado citoplasmático de la membrana celular, la unión del INF- α a su receptor desencadena la activación de las cinasas las cuales fosforilan a los factores de transcripción STAT 1 y 2 (signal transducer and activators of transcription) los cuales se unen al IRF-9 (factor de respuesta a interferón 9), formando el complejo de transcripción ISGF3 (interferon-stimulated gene factor 3), el cual migra al núcleo donde se une al DNA reconociendo las secuencias ISRE (interferon-stimulated response elements). Esto ocasiona la expresión de más de 100 genes estimulados por interferon (ISG), los cuales codifican proteínas que alteran el metabolismo celular,

intervienen con la replicación viral, síntesis de proteínas o ensamblaje de las partículas virales (Figura 10). Dentro de los genes sensibles a interferón se encuentran los siguientes^{30, 33, 34}

- **2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5' OAS):** Su función es activar a la endoribonucleasa RNAsa L, la cual degrada el RNAm y al RNAr viral y celular.
- **Protein cinasa R (PKR):** Es una serin-treonin cinasa, la cual fosforila el factor de inicio de la traducción eucariótico 2 α (eIF2 α). PKR es activada por dsRNA intracelular de más de 30 nt de longitud, esto provoca la activación de la enzima PKR y su autofosforilación lo que estabiliza su actividad de cinasa. La PKR activada fosforila al factor eIF2 α en el residuo de serina 51, lo que provoca una inhibición de la traducción.
- **Proteínas del myxovirus (Mx):** Son una gran familia de GTPasas. En el humano se han identificado dos GTPasas de esta familia la proteína MxA y MxB, ambas localizadas en el citoplasma. Solo MxA tiene actividad antiviral contra un gran espectro de virus, donde su propiedad antiviral radica en bloquear el transporte intracelular de componentes virales en células infectadas.
- **Adenosin deaminasa que actúa en RNA 1 (ADAR1):** Esta proteína esta envuelta en la edición del RNA, donde sustituye adenosinas por inosinas tanto en RNAm como en dsRNA viral. Las inosinas son residuos que se transcriben y se traducen en guaninas. La proteína ADAR1 tiene un peso molecular de 150 kDa, se localiza en citoplasma y núcleo de la mayoría de los tejidos.
- **Producto de 20 kDa del gen inducido por INF (ISG20):** Pertenece a la familia de las exonucleasas con actividad RNAsa y DNAsa, pero posee más afinidad por el RNA.
- **Producto de 54 kDa y 56 kDa de los genes inducidos por INF (ISG54 y ISG56):** Estas proteínas son tetratricopeptidos. Ambas se unen al factor de inicio de la traducción eucariótico eIF3 inhibiendo la traducción³².

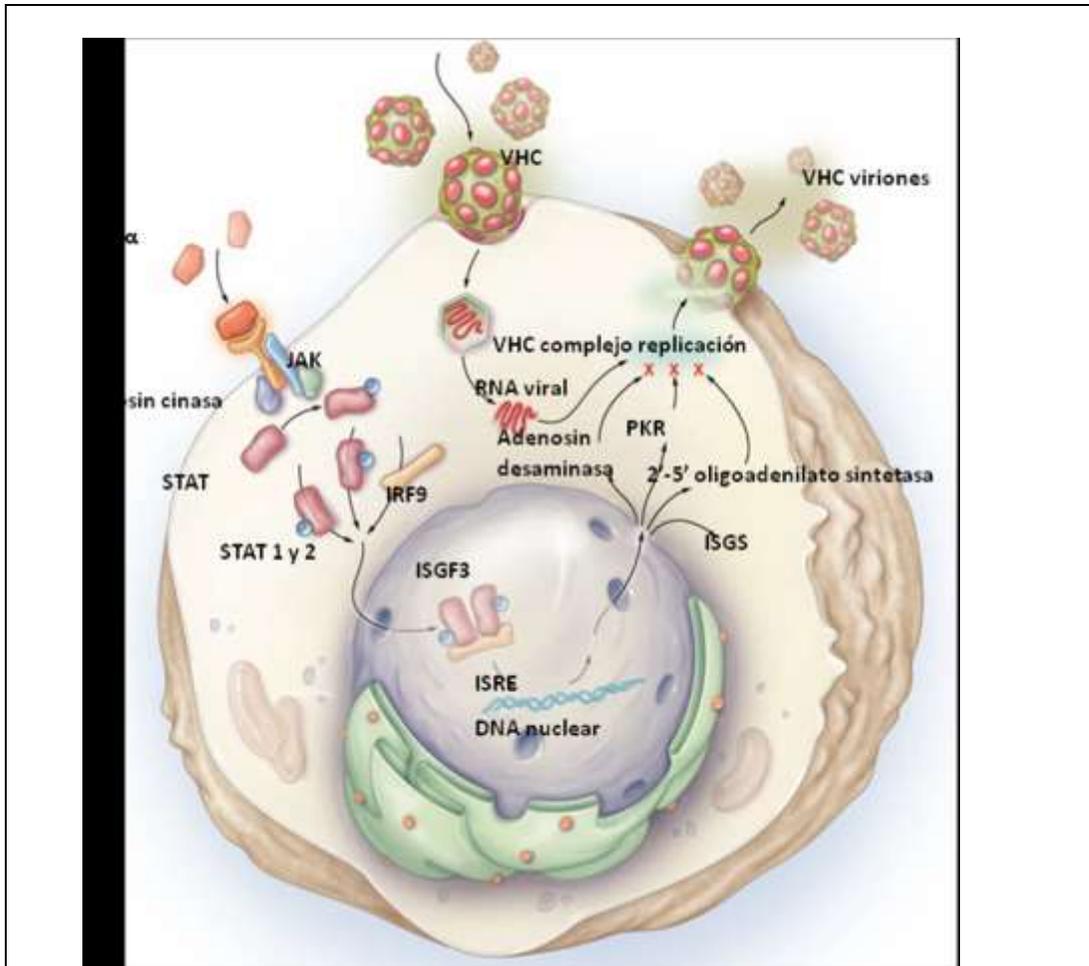


Figura 10: Mecanismo de acción propuesto para Interferón alfa contra VHC³⁰.

1.8.2 Mecanismo de acción de la Ribavirina.

La ribavirina es un análogo de guanósina sintetizado en 1970, e inmediatamente fue reconocido como un potente antiviral para RNA y DNA virus. En 1990 fue utilizada como monoterapia para el tratamiento de pacientes infectados con VHC. Aunque la mitad de los pacientes presentaron una disminución en los niveles séricos de las enzimas aminotransferasas, su efecto en la carga viral no fue significativo aun en pacientes con tratamiento durante tiempo prolongado. Sin embargo la adición de ribavirina al tratamiento con INF- α incremento el porcentaje de pacientes con una respuesta viral sostenida³¹. Su mecanismo de acción en contra del VHC no está completamente claro. Al parecer la ribavirina posee un efecto mínimo en contra de la replicación del VHC, pero puede conllevar a una rápida y letal mutación de los viriones, así como una disminución en los niveles intracelulares de trifosfato de guanósina, el cual es necesario para la síntesis de

RNA viral. Los cuatro mecanismos propuestos por los cuales posee su acción antiviral contra VHC son los siguientes (Figura 11):

- **Inhibición directa de la replicación de VHC:** Como un análogo de nucleósido, la ribavirina es fosforilado una vez que se encuentra dentro de la célula, y pasa a su forma monofosfato (RMP), difosfato (RDP) y trifosfato (RTP). La incorporación de RTP a la cadena nascente de RNA viral por la RNA polimerasa puede conllevar a la terminación o inhibición de la replicación. La incorporación de RTP se realiza en lugar de citosina o uridina.
- **Inhibición de la Inosin monofosfato deshidrogenasa (IMPDH):** El RMP es un inhibidor de la IMPDH, lo que conlleva a una disminución en la producción de GTP necesario para la síntesis de RNA viral.
- **Mutagénesis y error catastrófico:** Se ha propuesto que la ribavirina actúa como un mutagénico viral, causando una alta frecuencia de mutaciones en el RNA viral. Esto provoca la producción de partículas virales defectuosas carentes de capacidad infecciosa.
- **Inmunomodulador:** El balance de linfocitos CD4 T_H1 y T_H2 posee un papel relevante en la infección por VHC. Existen varios reportes en donde demuestran que una respuesta temprana de T_H1 ayuda a eliminar el virus, mientras que una respuesta de T_H2 favorece la infección crónica. Varios estudios sugieren que la ribavirina altera el balance T_H1/ T_H2 favoreciendo la proliferación de los linfocitos T_H1 ayudando a la eliminación de la infección por VHC³¹.

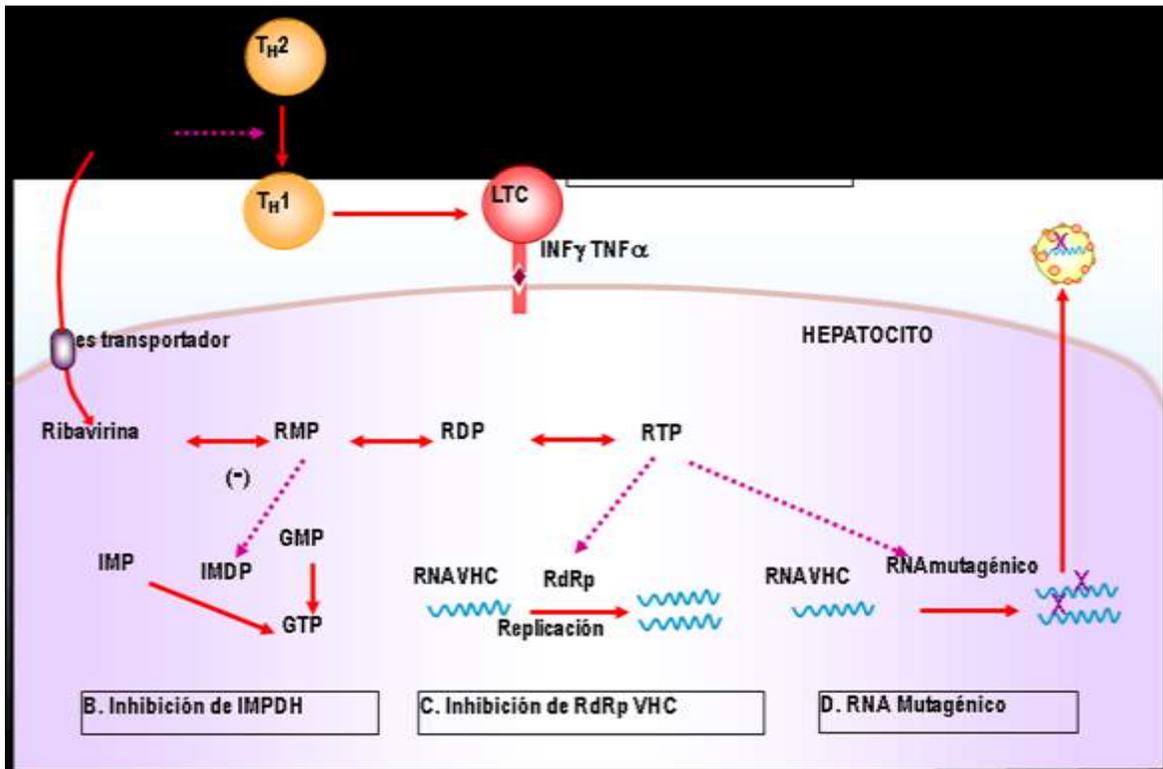


Figura 11: Mecanismos de acción propuestos a través de los cuales la ribavirina actúa en contra del VHC. Los mecanismos son: A) Inmunomodulación, B) Inhibición de inosin mofosfato deshidrogenasa (IMPDH), C) Inhibición directa de la replicación, D) Mutagénesis y error catastrófico³¹.

1.8.3 Tipos de INF-α

El interferón estándar utilizado como tratamiento para la infección por VHC a principios de los años noventa era una dosis de 3 millones de unidades tres veces por semana durante 6 meses, presentándose una respuesta viral sostenida (RVS) en solo del 6 al 12% de los pacientes. Estudios en la cinética viral mostraron que un incremento en la frecuencia de la administración de interferón incrementaba el porcentaje de pacientes con una RVS, sin embargo se presentaban un gran número de efectos adversos y la mayoría de los pacientes no toleraban el tratamiento^{35, 36}. Posteriormente se desarrolló el interferón pegilado (INF-PEG), el cual incrementa la vida media del interferón de 24 horas a una semana y de esta manera aumentó el porcentaje de pacientes respondedores, el polietilén glicol (PEG) es formado por una unión de unidades repetidas de etilén glicol, el cual forma un polímero lineal o ramificado creando moléculas de distinto peso, uniéndose

de manera covalente al INF. Dos tipos de INF-PEG han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de la hepatitis C crónica, conocidos como INF- α 2a pegilado e INF- α 2b pegilado, en donde el INF esta unido a moléculas de polietilen glicol de distinto tamaño. El INF- α 2a pegilado conocido comercialmente como Pegasys® de Roche posee un peso molecular de 40 kDa, el INF- α 2a posee cuatro residuos de lisina en donde se une la molécula PEG en las posiciones 31, 121, 131 y 134, mediante interacciones amida las cuales son muy estables³⁷. El INF- α 2b pegilado conocido comercialmente como PegIntron® de la marca Schering-Plough es una molécula linear que posee un peso molecular de 12 kDa, esta molécula es monopegilada en el residuo de histidina en la posición 34^{38, 39}. Manns y cols⁴⁰ realizaron un estudio en 511 pacientes con hepatitis C crónica, los cuales fueron tratados con INF- α 2b pegilado 1.5 μ g/kg de peso por semana más 800 mg de ribavirina al día durante 48 semanas presentándose una RVS en el 54% de los pacientes. En otro estudio realizado por Fried y cols⁴¹ reportaron que en 453 pacientes tratados con 180 μ g de INF- α 2a pegilado más 1000 o 1200 mg de ribavirina (dependiendo del peso) durante 48 semanas se presentó una RVS en el 56% de los pacientes. Estos estudios mostraron una eficiencia similar en ambos medicamentos, se presentó una mejor respuesta en pacientes con genotipo 2 y 3, sin embargo no se incluyeron en estos estudios niños, pacientes con VIH, pacientes trasplantados, con insuficiencia renal o cirrosis descompensada. Por tanto, los resultados de estos estudios no pueden ser generalizados hacia todos los grupos de pacientes.

Los esquemas de terapia de combinación contra hepatitis C se resumen en la siguiente tabla^{32,38,39}:

Tratamiento	Genotipo 1	Genotipo 2 y 3
Peginterferón alfa-2b	1.5 μ g/kg/semana más ribavirina 400 mg c/12 horas por 48 semanas	1.5 μ g/kg/semana más ribavirina 400 mg c/12 horas por 24 semanas
Peginterferón alfa-2a	180 μ g/semana, más ribavirina, 1000 mg/día para pesos <75 kg, 1200 mg/día para pesos \geq 75 kg de ribavirina por 48 semanas.	180 μ g/semana, más ribavirina 800 mg/día por 24 semanas.

Cuadro 7: Regímenes de tratamiento para hepatitis C^{32, 38, 39}.

1.8.4 Tipos de respuesta al tratamiento

La respuesta a la terapia se monitorea con la medición del RNA en suero; y existen en general tres respuestas al tratamiento (Figura 12):

- **Ausencia de Respuesta o pacientes no respondedores:** Se define como la presencia de RNA viral en sangre durante el tratamiento con valores similares a los valores basales.
- **Respuesta virológica sostenida (RVS):** Se define como la ausencia de RNA viral en sangre durante tratamiento y 6 meses después de finalizar el mismo. Esta respuesta se presenta en aproximadamente el 50% de los pacientes.
- **Pacientes con una respuesta transitoria o recaída:** Se define como la disminución de los valores de RNA viral en sangre sin alcanzar la negativización completa durante el tratamiento. Este tipo de respuesta ocurre aproximadamente el 10-25% de los pacientes. La causa porque estos pacientes responden de manera parcial al tratamiento no están elucidadas; estos pacientes se consideran pacientes no respondedores al tratamiento³¹.

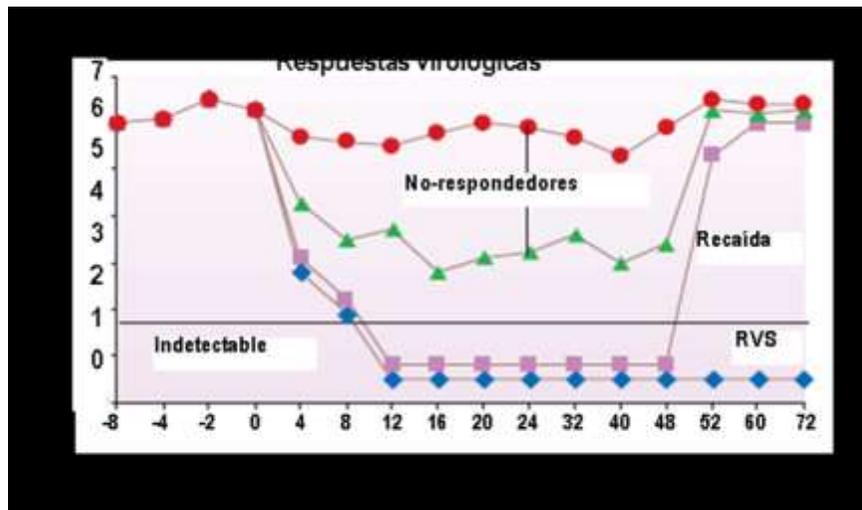


Figura 12: Respuesta virológica al tratamiento por VHC. Diferentes patrones de la respuesta viral durante el tratamiento con INF-PEG y ribavirina³¹.

Los pacientes con una RVS se caracterizan por un perfil cinético en el declinación de la carga viral; en donde la carga viral desciende rápidamente durante las primeras 24-48 horas después de haber iniciado el tratamiento y un segundo descenso gradual durante las siguientes semanas del tratamiento (Figura 13)³¹.

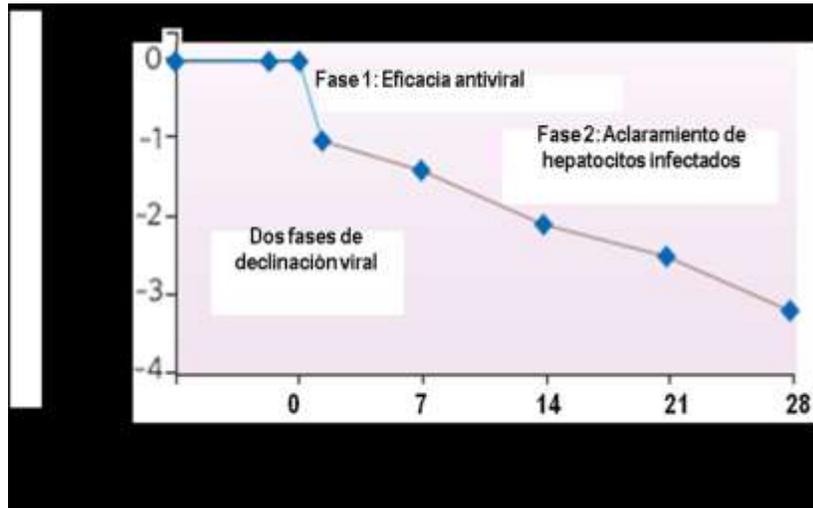


Figura 13: Cinética viral durante el tratamiento con INF-PEGα y ribavirina en pacientes con hepatitis C crónica. Descenso de la carga viral en pacientes con una RVS³¹.

Existen una serie de factores que se han relacionado con una respuesta favorable al tratamiento estándar con INF-PEGα y Ribavirina, los cuales se muestran en el cuadro 8:

FACTORES

- **Virales**

- Genotipos 2 y 3
- Carga viral baja
- Infección aguda
- Una gran diversidad de quaepecies.

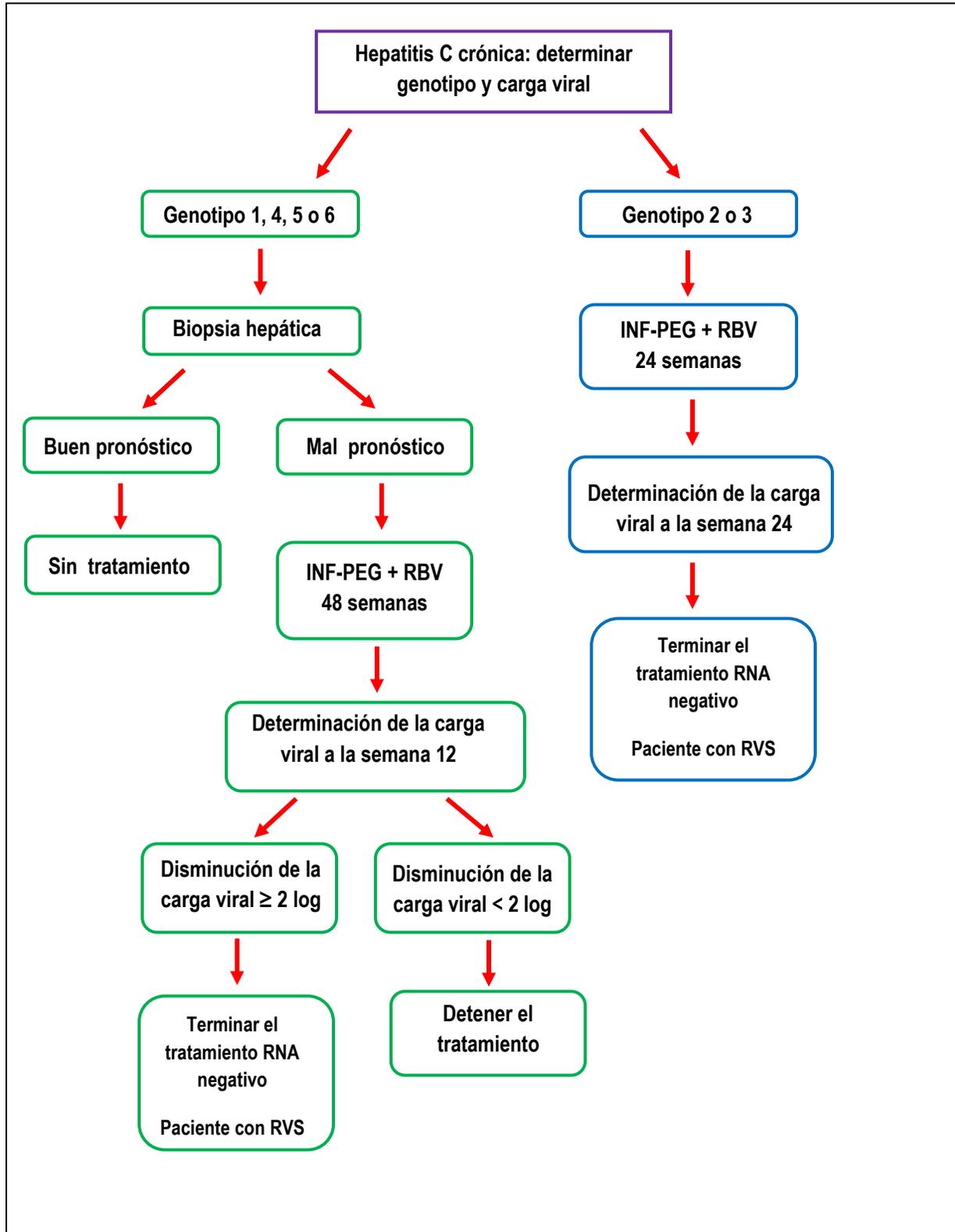
- **Huésped**

- Edad joven al momento del tratamiento
- Sexo femenino
- Bajo grado de fibrosis
- Bajo índice de masa corporal (IMC)
- Raza no afro-americana
- Ausencia de condiciones co-mórbidas (ingesta de alcohol, co-infección con VIH o con otros virus, enfermedad renal, etc.).

Cuadro 8: Factores relacionados con una respuesta favorable a la terapia estándar³¹.

1.8.5 Algoritmo del tratamiento de la hepatitis crónica por VHC

La duración del tratamiento antiviral se establece de acuerdo al genotipo viral, que es el factor pronóstico de respuesta viral más importante. En pacientes con genotipo 1 o 4 tienen una respuesta sostenida del 42% al 46% y deben de recibir tratamiento durante 48 semanas para optimizar la consecución de una respuesta sostenida^{38,39,42}. Los pacientes con genotipos 2 o 3 tienen respuestas sostenidas del 78% al 82% y deben de recibir tratamiento por 24 semanas. El interferón pegilado se administra por vía subcutánea una vez por semana, y la ribavirina se administra por vía oral divide la dosis diaria en dos tomas. La identificación precoz de los pacientes no respondedores, permite la suspensión del tratamiento en este tipo de pacientes. Menos del 2% de los pacientes, en los que la determinación cuantitativa del RNA de VHC no es negativo o no disminuye como mínimo 2 logaritmos en la semana 12 del tratamiento, conseguirán una RVS, por lo que el tratamiento se suspende bajo estas circunstancias, con la finalidad de prevenir un tratamiento inútil y reducir el costo⁴³.



Cuadro 9: Esquema de tratamiento para pacientes con hepatitis C crónica³².

1.8.6 Selección de pacientes aptos para el tratamiento

Las recomendaciones actuales para el tratamiento de personas con hepatitis C crónica se generan de diversos estudios clínicos^{44,45}. Se excluyen aquellos pacientes en los que se podría comprometer la respuesta a la terapia como: pacientes coinfectados con VIH, niños, pacientes con depresión y pacientes con abuso activo de sustancias; que además es frecuente este tipo de pacientes con VHC. Para elegir a un paciente candidato para la terapia se requiere una valoración de riesgos y beneficios terapéuticos.

Las características de las personas en las que la terapia es ampliamente aceptada:

- Ser mayores de 18 años de edad.
- Valores de ALT normales.
- Biopsia hepática mostrando hepatitis crónica con fibrosis significativa (más que fibrosis portal: Puntaje Metavir ≥ 2 ; Puntaje Ishak ≥ 3).
- Hepatitis crónica compensada (bilirrubina sérica total < 1.5 g/dL; albúmina > 3.4 g/dL; cuenta de plaquetas $> 75,000$ k/mm³; y sin evidencia de encefalopatía hepática o ascitis).
- Índices hematológicos y bioquímicas aceptables (hemoglobina > 13 g/dL para hombres y > 12 g/dl para mujeres; cuenta de neutrófilos > 1.5 k/mm³; creatinina < 1.5 mg/dl).
- Pacientes tratados previamente contra la infección por VHC.
- Historia de depresión, pero la condición debe de estar bien controlada.
- Dispuesto a ser tratado y conforme los requerimientos del tratamiento^{42,43,44,12}.

Las características de los pacientes en los cuales la terapia debe ser individualizada:

- Valores de ALT persistentemente normales.
- Falla de tratamiento previo (sin respuesta o recaídas) habiendo sido tratados ya sea con interferón administrado solo o en combinación con ribavirina, o peginterferón administrado como monoterapia.
- Estén usando drogas ilícitas o alcohol actualmente, pero que estén dispuestos a participar en un programa de abuso de sustancias.
- Evidencia por biopsia hepática de que no hay fibrosis o esta es demasiado leve (Puntaje Metavir < 2 , Puntaje Ishak < 3).
- Hepatitis C aguda.
- Co-infectados con VIH.

- Menos de 18 años de edad.
- Falla renal crónica.
- Cirrosis descompensada.
- Paciente con trasplante hepático^{42,43,44,12}.

Las características de los pacientes en los cuales la terapia esta actualmente contraindicada:

- Enfermedad depresiva mayor, no controlada.
- Paciente que recibió trasplante renal, cardiaco o pulmonar.
- Hepatitis autoinmune u otra condición que se sabe que es exacerbada por interferón y ribavirina.
- Hipertiroidismo no tratado.
- Embarazo o no deseo/incapacidad de usar métodos anticonceptivos rigurosos.
- Enfermedad concurrente severa como hipertensión severa, falla cardiaca, enfermedad arterial coronaria significativa, diabetes mal controlada, enfermedad obstructiva crónica.
- Menos de 3 años de edad.
- Cirrosis descompensada.
- Trombocitopenia < 50,000 células/ml.
- Neutropenia < 0.50 x 10⁹/L.
- Anemia < 8.5 g/dL.
- Leucopenia < 1.0 x 10⁹/L.
- Hipersensibilidad conocida a los fármacos usados para tratar VHC^{42,43,46,14}.

1.8.7 Efectos Adversos.

Los efectos adversos del interferón pegilado (2a y 2b) son numerosos y su incidencia es bastante elevada; ya que aproximadamente el 75% de los pacientes tratados experimentan uno o más de los siguientes efectos secundarios: astenia, fiebre, mialgias, cefalea, escalofríos, insomnio, náuseas, anorexia, pérdida de peso, alopecia, irritabilidad, depresión, reacción en el lugar de la inyección, exacerbación de enfermedades autoinmunes (eccema, psoriasis, enfermedad tiroidea, etc.), neutropenia, trombocitopenia, anemia hemolítica, disnea, rash, tos, depresión, prurito, eritema, alopecia, piel seca; entre

otros^{38,39,47}. Muchos de ellos pueden hacer interrumpir el tratamiento o descender la dosis de los fármacos⁴⁸. La función tiroidea y las cifras de neutrófilos y plaquetas (biometría hemática) durante la terapia⁴⁹.

1.9 Terapias emergentes para el tratamiento con Hepatitis C.

El objetivo de la terapia en hepatitis C es inducir en los pacientes una RVS, lo cual equivale a la erradicación de la infección por VHC y por tanto la cura de la enfermedad⁵⁰. Sin embargo aproximadamente el 50% de los pacientes no responden a la terapia⁵¹. Es por eso que se necesitan implementar nuevas terapias para este tipo de pacientes. Avances en la determinación de la estructura de las proteínas del VHC, así como el estudio de modelos *in vitro* como el de replicones subgenómicos han permitido el desarrollo de componentes que están en fase de investigación pre-clínica o clínica, para el tratamiento de VHC, los cuales se resumen en la siguiente tabla (Cuadro 10)¹.

Tratamiento	Laboratorio	Fase de estudio
<p>INF DE LARGA ACCIÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> Albinterferón Locterón (BLX-883) Interferón Omega 	<p>Novartis Bidex Intarcia Therapeutics</p>	<p>Fase clínica 3 Fase clínica 2 Fase clínica 2</p>
<p>INF VIA ORAL</p> <ul style="list-style-type: none"> Belerofon 	<p>Nautilus Biotech</p>	<p>Fase clínica 1</p>
<p>STAT-C</p> <p>-NS3/4 Inhibidores de Proteasa</p> <ul style="list-style-type: none"> Telaprevir (VX-950) Boceprevir (SCH 503034) ITMN-191 <p>-NS5B Inhibidores de Polimerasa</p> <p>a) Análogos de Nucleósidos</p> <ul style="list-style-type: none"> R1626/R1479 R1656/R7128 MK608 <p>b) No Nucleósidos inhibidores de polimerasa</p> <ul style="list-style-type: none"> A-837093 GS-9190 <p>-NS5A inhibidores</p> <ul style="list-style-type: none"> A-831 A-689 	<p>Vertex Schering-Plough InterMune</p> <p>Roche Roche Merck</p> <p>Abbott Gilead</p> <p>Astrazeneca Astrazeneca</p>	<p>Fase clínica 2 Fase clínica 2 Fase clínica 1</p> <p>Fase clínica 2 Fase clínica 1 Pre-clínica</p> <p>Pre-clínica Fase clínica 1</p> <p>Fase clínica 1 Pre-clínica</p>
<p>INHIBIDORES DE CICLOFILINA</p> <ul style="list-style-type: none"> DEBIO-25 NIM811 	<p>Debiopharm</p>	<p>Fase clínica 1 Pre-clínica</p>
<ul style="list-style-type: none"> Zadaxin o timalfasin 	<p>Sisiclones</p>	<p>Aprobado por la FDA para HCC</p>

Cuadro 10: Terapias emergentes para el tratamiento de VHC³.

II. ANTECEDENTES

2.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) constituyen un grupo de fármacos químicamente heterogéneo que poseen acción analgésica, antiinflamatoria y antipirética, además de otros efectos⁵². El mecanismo de acción de los AINES radica en la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, la cual participa en la síntesis de prostaglandinas (particularmente PGE₂ y PGI₂) a partir del ácido araquidónico⁵³. Se han descrito tres isoformas de la enzima COX: COX-1 es una enzima constitutiva que se expresa en casi todos los tejidos, especialmente en riñón, plaquetas y tracto gastrointestinal, su función es proteger el epitelio gástrico, el funcionamiento renal así como también participa en la agregación plaquetaria; COX-2, parece expresarse en algunas células bajo el efecto inductor de determinados estímulos como algunos mediadores químicos de la inflamación, oncogenes, promotores tumorales, factores de crecimiento, endotoxinas y mitógenos. La isoforma COX-3 corresponde a una variante producida por splicing alternativo de COX-1, se expresa en células de tejido nervioso^{54, 52}.

La mayoría de los AINES actualmente disponibles inhiben de manera no selectiva la actividad enzimática de ambas isoformas (COX-1 y COX-2), esta inhibición es de forma estereoespecífica, competitiva (es decir compiten con el sustrato por el mismo sitio activo) y reversible, inhibiendo la mayoría de manera preferencial a la COX-1. La aspirina (AAS) es el único inhibidor irreversible de ambas isoformas (no selectivo) ya que acetila la serina 530 del sitio activo⁵⁴.

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

Como antecedentes de nuestro laboratorio tenemos que Trujillo-Murillo y cols.¹ reportaron que empleando el modelo de replicones subgenómicos del VHC (el cual expresa de manera constitutiva las proteínas no estructurales del VHC) en células Huh-7 (hepatocitos humanos), la aspirina (AAS) a una concentración de 4 mM disminuyó hasta un 58% los niveles del RNA viral con respecto a las células Huh-7 replicón sin tratamiento. Este evento fue dependiente del tiempo de exposición, siendo más evidente a las 72 horas post-tratamiento (**P<0.001) (Figura 14).

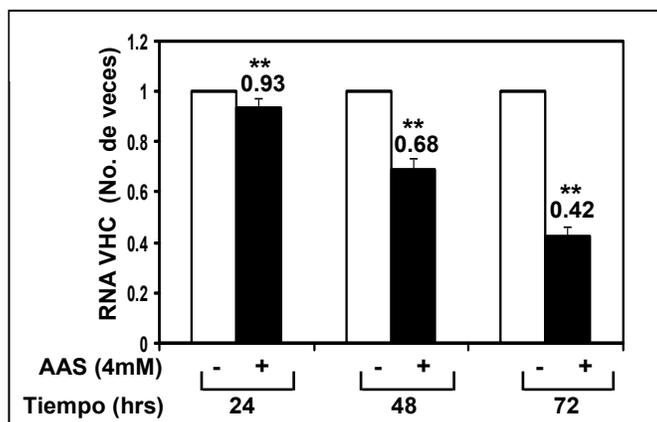


Figura 14: Efecto del AAS en los niveles del RNA viral. Resultado de la PCR cuantitativa en tiempo real (**P< 0.01)¹.

El AAS también disminuyó los niveles de las proteínas virales de manera directamente proporcional al tiempo de exposición, ya que la proteína viral NS5A disminuyó hasta un 68% comparada con el control sin tratamiento (Figura 15).

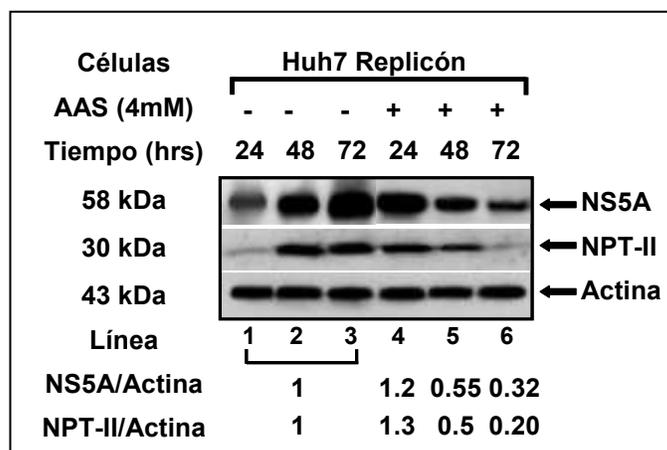


Figura 15: Efecto del AAS en los niveles de las proteínas virales¹.

También se observó mediante ensayos de western blot que los niveles de la proteína celular COX-2 disminuyeron cuando las células que contienen el replicón subgenómico del VHC fueron expuestas a una concentración de 4 mM de AAS (Figura 16). Con esto se demostró que la aspirina regula de manera negativa la replicación y expresión génica del

VHC y que este efecto parece ser modulado por COX-2, el cual es un intermediario de la vía del estrés oxidativo¹.

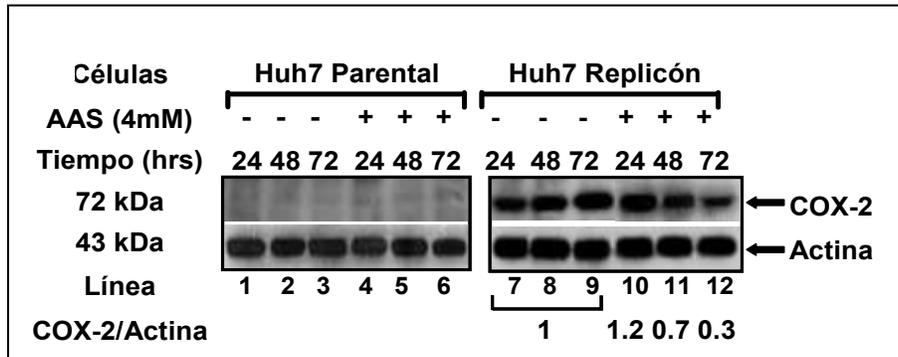


Figura 16: Efecto del AAS en los niveles de la proteína COX-2¹.

III. JUSTIFICACIÓN

En nuestro laboratorio hemos observado *in vitro* que la Aspirina (AAS) disminuye los niveles del RNA y proteínas virales; efecto que parece ser mediado por diversos mecanismos como: modulación de los sistemas antioxidantes de la vía de señalización COX-2. Sin embargo se desconoce si el efecto antiviral es exclusivo del AAS, o si es una propiedad característica de los AINEs.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son fármacos ampliamente utilizados a nivel mundial. Además es interesante evaluar si este efecto se produce *in vivo*.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de Diclofenaco, Salicilato de Sodio e Indometacina en la replicación y expresión génica en el modelo de replicones subgenómicos del VHC; así como realizar un estudio clínico-exploratorio para evaluar el efecto de la Aspirina y el Diclofenaco, en la carga viral de los pacientes con hepatitis C.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del Diclofenaco (DCF), Indometacina (Indo) y Salicilato de sodio (SalNa) en la replicación y expresión génica, en el modelo de replicones subgenómicos del VHC.
2. Evaluar el tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos (AAS Y DCF) como monoterapia o terapia combinada con INF-PEG y RBV en la carga viral de pacientes con hepatitis C.
3. Evaluar los efectos adversos al tratamiento en los pacientes incluidos en el estudio clínico.
4. Analizar las variables demográficas, clínicas, virológicas y marcadores de estrés oxidativo en los pacientes tratados con AAS y DCF.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo el siguiente número de registro BI05-007.

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

5.1 REACTIVOS

5.1.1 Cultivo Celular

Los procedimientos de cultivo celular se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar, para el mantenimiento de las línea celular Huh-7 se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (DMEM), L-Glutamina (200 mM; 100X), Suero Bovino Fetal (SBF), Tripsina-EDTA (1x), antibiótico Penicilina-Estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina), solución de aminoácidos no esenciales 10 mM (100X) y Geneticina (sulfato G-418) de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA). El material de plástico que se utilizó en cuarto de cultivo consistió en tubos falcón de 15 y 50 ml, botellas de cultivo de 75 cm², placas de cultivo de 35 mm x 10 mm, raspadores de células, pipetas desechables de 5 y 10 ml de la marca Corning (Corning, NY, USA). El Diclofenaco, el Salicilato de Sodio y la Indometacina fueron adquiridos de la compañía SIGMA (St. Louis, MO, USA).

5.1.2 Viabilidad Celular

Se utilizó el colorante azul tripano 0.4% de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA) y el reactivo azul alamar de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

5.1.3 Extracción de RNA total en células

Se realizó a partir de células en monocapa se empleó el reactivo Trizol de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Cloroformo de la marca Fisher Scientific (New Jersey, USA), Etanol de la marca Merck (Darmstadt, Germany) , Isopropanol de la marca Fisher Scientific (New Jersey, USA) y RNA OUT de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

5.1.4 Western Blot

Para la extracción de proteínas totales se utilizaron inhibidores de proteasas de la marca Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Una vez realizada la extracción las proteínas fueron cuantificadas con el reactivo de Bradford de la marca BIO-RAD (Hercules, CA, USA), utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina de la marca Amresco (Solon, Ohio).

Para preparar los geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida y bis-acrilamida de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA), se utilizó el marcador de peso molecular de la marca Promega (Madison, WI, USA), se utilizaron los catalizadores TEMED y PSA de la marca SIGMA CHEMICAL COMPANY (St, Louis, MO, USA). Las proteínas fueron transferidas del gel de poliacrilamida a la membrana Hybond-P PVDF de la marca Amersham Biosciences (Freiburg, Germany). Para verificar la transferencia de las proteínas, la membrana fue teñida con el colorante rojo de Ponceau S de la marca Amresco (Solon, Ohio, USA).

Los anticuerpos monoclonales que se utilizaron para detectar las proteínas celulares fueron los siguientes: anticuerpo anti-COX-2 de la marca Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) y el anticuerpo anti-actina de la marca MP Biomedicals (Aurora, Ohio, USA). Para detectar las proteínas virales se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-VHC NS5A de la marca Biodesign International (Saco, ME, USA) y el anticuerpo policlonal anti-NPT-II de la marca Cortex Biochem (San Leandro, CA, USA). Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron: anti-rabbit y anti-mouse de la marca Promega (Madison, WI, USA).

5.1.5 PCR Cuantitativa en Tiempo real (qPCR)

Para la cuantificación relativa del RNAm del VHC se utilizó como gen endógeno Glicerinaldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La cuantificación se realizó en dos etapas: primero se sintetizó el cDNA a partir de RNA viral y celular mediante una RT-PCR para ello se utilizó el kit High-Capacity cDNA Archive de la marca Applied Biosystems

(Foster City, CA, USA). Posteriormente, se realizó la PCR en tiempo real empleando el ensayo HCVUANL-CV1 identificado con el número 65329451, el cual contiene la sonda Taqman y los oligos que se alinean en la región 5'UTR del VHC, además se empleó el reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Para normalizar los resultados se utilizó el ensayo de GAPDH 20X de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Para la cuantificación absoluta se realizó una curva empleando diferentes concentraciones del plásmido pFK₃₉₈-NS3-3' portador de la secuencia nucleotídica del replicón del VHC; el cual fue donado por el Dr. Koromilas del Lady Davies Institute, McGill University, Canadá.

5.1.6 Niveles Intracelulares de prostaglandinas E₂ (PGE₂)

Se cuantificaron los niveles intracelulares de PGE₂ mediante el kit de ELISA de la marca Amersham Biosciences (Freiburg, Germany).

5.1.7 Extracción de RNA viral a partir de plasma

Para la extracción del RNA del VHC se utilizaron las columnas QIAamp UltraSens Virus Kit de la marca QIAGEN (Valencia, CA, USA).

5.1.8 Niveles séricos de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) a partir de suero

Se cuantificaron niveles séricos de TBARS mediante el kit de la marca OXItek (Buffalo, NY, USA).

5.1.9 Niveles de Glutación peroxidasa (Gpx) a partir de plasma

Se cuantificaron los niveles plásmaticos de Gpx mediante el kit de la marca OXItek (Buffalo, NY, USA).

5.1.10 Niveles de Súper Oxido Dismutasa (SOD) a partir de suero

Se cuantificaron los niveles de SOD mediante el kit de la marca Cayman Chemical (Miami, FL, USA).

5.1.11 Niveles séricos de transaminasas

Se cuantificaron los niveles de AST (aspartato aminotransferasa) y ALT (alanino aminotransferasa) mediante química seca utilizando el equipo VITROS DT60 II.

5.1.12 Determinación del Genotipo del VHC.

Se determinó el genotipo de los pacientes VHC mediante el kit HCV Genotype Amplification Kit (LiPA) Versant de la marca Bayer (Barmen, Germany). La extracción de RNA se realizó a partir de Plasma por medio de la técnica de Chomczynsky y Sacchi modificado, para lo cual se utilizó Trizol de la marca (Carlsbad, CA, USA), la RT-PCR se realizó utilizando la enzima MMLV de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

5.2 EQUIPO

5.2.1 Cultivo Celular

- Campana de flujo laminar clase II, tipo A2, marca Nuaire.
- Incubadora de CO₂, Marca Nuaire.
- Centrifuga Centra CL2, Marca Thermo Electron Corporation.

5.2.2 Western blot

- Cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN 3 Cell, Marca BIO-RAD (Hercules, CA, USA).
- EpiChemi³ Darkroom, Marca UVP Bioluminescence Systems (Upland, CA, USA).
- Gyrotwister, Marca Labnet.

5.2.3 Extracción de RNA y proteínas totales.

- Centrifuga Refrigerada, Marca Heraeus (Osterode, Germany).

5.2.4 Cuantificación de cDNA y Proteínas totales.

- Biofotómetro, Marca Eppendorf (Hamburg, Germany).
- Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, Marca Thermo Fisher Scientific (Suwanee, GA, USA).

5.2.5 PCR en Tiempo Real

- ABI PRISM 7000, Marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

5.2.6 Viabilidad Celular

- Espectrofotómetro de placa de 96 pozos Multiskan Ex de la marca Labsystems (Franklin, MA, USA).

5.2.7 Separación de suero y plasma.

- Centrifuga refrigerada para tubos de ensaye IEC Centra CL2 de la marca Thermo Fisher Scientific (Suwanee, GA, USA).
- Campana de flujo laminar clase II, tipo A, modelo LV-120 de la marca Lumistell (Celaya, Guanajuato, México).

5.2.8 Cuantificación de Glutación Peroxidasa (Gpx)

- Espectrofotómetro DU 530, Marca BeckMan Coulter (Fullerton, CA, USA).

5.2.9 Cuantificación de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

- Fluorómetro LS-55, marca Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA).

5.2.10 Cuantificación de Súper Oxido Dismutasa (SOD)

- Espectrofotómetro de placa de 96 pozos Elx800 de la marca Biotek (Winnoski, Vermont, USA).

5.2.11 Cuantificación de Prostaglandinas (PGE₂)

- Espectrofotómetro de placa Elx800 de la marca Biotek (Winnoski, Vermont, USA).

5.2.12 Cuantificación de Transaminasas (ALT y AST)

- Sistema químico compacto VITROS DT60 II de la marca Johnson and Johnson (New Brunswick, NJ, USA).

5.2.13 Biometría Hemática

- Analizador Hematológico Cell Dyn 1700 de la marca GMI (Ramsey, Minnesota, USA).

5.3 MATERIAL BIOLÓGICO

5.3.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo celular

Se utilizó la línea celular de hepatoma humano Huh-7 replicón que expresa de manera estable las proteínas no estructurales del VHC, que fue donada por el Dr. A Koromilas (Lady Davies Institute, McGill University, Canadá). La línea celular fue crecida en medio de cultivo DMEM Advanced (GIBCO-BRL) suplementado con 2% de suero bovino fetal (SBF), 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales y en presencia de 500 µg/ml del fármaco G418 (Geneticina, GIBCO-BRL) que se utilizó como marcador de selección, una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ a 37°C (ver anexo 1). La geneticina fue removida un día antes de realizar los experimentos.

5.4 ANÁLISIS DE DATOS

El procesamiento de datos se llevó a cabo en una computadora personal DELL. El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word XP, Microsoft® Power Point XP y Microsoft® Excel de Microsoft Corporation. Para el análisis densitométrico de las imágenes se utilizó el programa Phoretix\1D versión 2003.02.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 13.0.

5.5 MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos específicos 1 y 2 (estudio *in vitro*) se siguió la siguiente estrategia general (Fig 17).

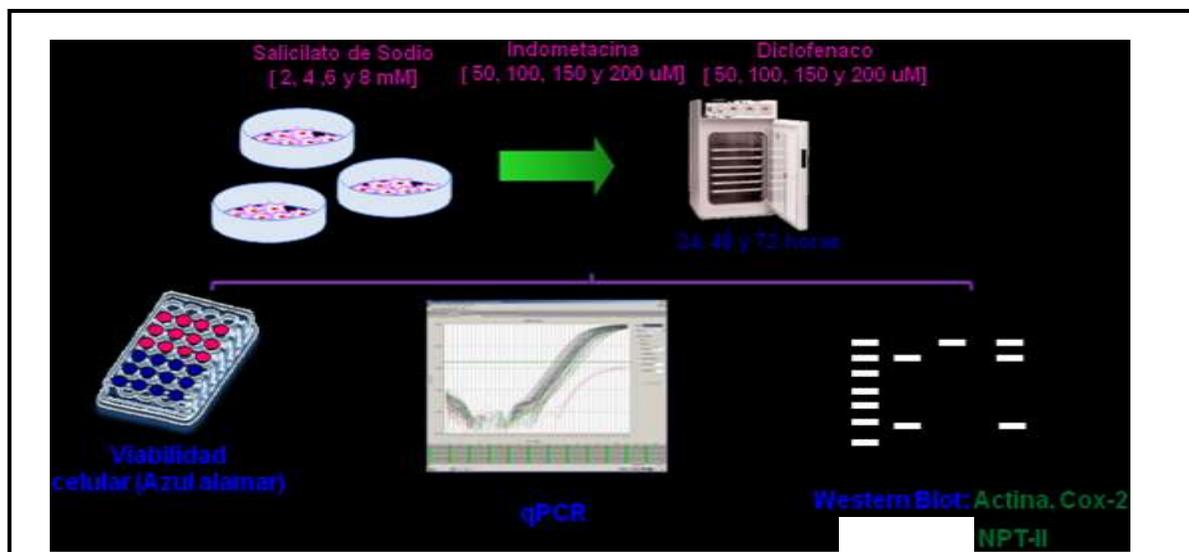


Figura 17. Estrategia general ensayo *in vitro*

5.5.1 Tratamiento con DCF, SalNa o INDO

Las células Huh-7 que expresan el replicón fueron sembradas a una confluencia de 2×10^6 células por placa (ver anexo 2) e incubadas con Diclofenaco (50, 100 y 150 μM), Salicilato de Sodio (2, 4 y 6 mM) o Indometacina (50, 100 y 150 μM) durante 24, 48 y 72 horas. Se utilizaron como control células Huh-7 replicón sin tratamiento. Para seleccionar las concentraciones de cada fármaco que no fueran tóxicas para las células se realizaron ensayos de viabilidad celular con azul alamar, para el cual se sembraron 1.5×10^4 células Huh-7 replicón con y sin tratamiento a los diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) en una placa de 96 pozos.

Las células fueron incubadas durante 5 horas aproximadamente (hasta observar un cambio de coloración de azul intenso a magenta en las células control) con medio DMEM Advanced que contenía el 10% del reactivo azul alamar (A una concentración de un 10%) (ver anexo 3). Posteriormente, las muestras fueron leídas a dos longitudes de onda 570 nm y 600 nm en un lector de placas de 96 pozos. Una vez obtenida la absorbancia para ambas longitudes de onda, se realizaron los cálculos y se reportó el porcentaje de viabilidad celular (% de células vivas) con respecto a las células que no fueron tratadas (100% de viabilidad celular).

5.5.2 Extracción de RNA total a partir de células en monocapa

1. Se adicionó 1 ml de Trizol a las células Huh-7 replicón en monocapa a cada pozo de 35mm x 10 mm, una vez realizado esto el contenido fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente con el propósito de favorecer la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
3. Posteriormente, se adicionaron 200 μl de cloroformo por cada 1 ml de reactivo Trizol, y se mezcló por inversión durante 15 segundos.
4. Se incubó en hielo aprox. 3 minutos.
5. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
6. Después de la centrifugación se recuperó en un tubo nuevo la fase acuosa. Para la precipitación del RNA, se adicionó 0.5 ml de Isopropanol por cada 1 ml de reactivo de Trizol, e incubó a -70°C por 15 minutos a temperatura ambiente por 10 min.
7. Se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 10 min a 4°C.

8. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con 1 ml de etanol al 70% (el cual se diluye con agua DEPC) por cada 1 ml del reactivo de trizol, se mezcló en el vortex.
9. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C.
10. Por último se secó la pastilla de RNA por 5 a 10 min a temperatura ambiente, y se resuspendió con 30 µl de agua DEPC.

5.5.3 Cuantificación relativa del RNA viral por RT-PCR en Tiempo Real

La cuantificación se llevo a cabo en dos pasos:

- **Paso 1. Síntesis de cDNA**

Una vez realizada la extracción de RNA total a partir de células Huh-7 replicón, este fue sujeto a retrotranscripción. Se preparó la siguiente mezcla de reacción (Cuadro 11).

Cuadro 11. Condiciones de reacción para la RT

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen por reacción	Concentración Final
Buffer RT	10X	2 µl	1X
dNTPs	25X	0.8 µl	1X
Random Primer	10X	2 µl	1X
Enzima MultiScribe RT	50 U/µl	1 µl	2.5 U
Agua DEPC	-----	4.2 µl	-----
RNA	Dilución 1:10	10 µl	-----
Volumen final		20 µl	

El programa para la retrotranscripción fue el siguiente (Cuadro 12)

Cuadro 12. Programa RT

Tiempo	Temperatura °C
10 min	25
2 h	37

• **Paso II. PCR en Tiempo Real**

Una vez obtenido el cDNA se cuantificó la muestra y a partir de la concentración obtenida se realizó una dilución para obtener una concentración de 200 ng. Para la PCR se utilizaron los iniciadores: 5'-GCG TCT AGC CAT GGC GTT A-3' (Forward) y 5'-GGT TCC GCA GAC CAC TAT GG-3' (Reverse), los cuales se alinean en la región 5'UTR del VHC. La sonda Taqman utilizada fue 5'-FAM- CTG CAC GAC ACT CAT AC-NFQ-3'. Se empleó el termociclador ABI PRISM 7000 de la marca Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones de reacción (Cuadro 13).

Cuadro 13. Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen por reacción	Concentración final
TaqMan Universal PCR master mix	2x	12.5 µl	1x
Ensayo de HCV o GAPDH	20x	1.25 µl	1x
cDNA diluido en agua DEPC	-----	11.25 µl	-----
Total		25 µl	

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Cuadro 14).

Cuadro 14. Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real

Tiempo	Temperatura °C
2 min	50
10 min	95
15 seg	95
1 min	60

Para normalizar la cuantificación de los niveles del RNA viral se amplificó bajo las mismas condiciones el gen GAPDH.

5.5.4 Extracción de Proteínas totales a partir de células en monocapa

1. A partir de una placa de 100 mm x 20 mm a una concentración de 5×10^5 células Huh-7 replicón sin tratamiento y tratadas con Diclofenaco, Salicilato de sodio o Indometacina a las distintas concentraciones durante 24, 48 y 72 h, se les retiró el medio de cultivo, y se lavaron con 2 ml de buffer PBS 1X. Posteriormente se retiró el buffer.
2. A cada placa de cultivo se le adicionaron 2 ml del buffer PBS 1X + EDTA 1 mM, las células fueron cosechadas utilizando un raspador de células (ver anexo 8).
3. Posteriormente, el extracto celular se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 4°C por 1 minuto.
4. Se retiró el sobrenadante y a la pastilla celular se le agregaron 10 volúmenes del buffer de lisis completo 1x (ver anexo 8). A la pastilla celular obtenida de estas placas se le agregó 30 µl del buffer de lisis 1x.
5. Se mezcló en vortex por 10 seg, se incubó en hielo durante 10 min, se mezcló nuevamente, y colocó en hielo por 10 minutos.
6. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5-10 minutos a 4°C.

7. El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf de 0.6 ml y se descartó la pastilla.
8. Las proteínas extraídas fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

5.5.5 Western Blot

Se cuantificaron las proteínas totales con el método de Bradford (ver anexo 7). Se colocaron en el gel (SDS-PAGE) 40 μg , las cuales fueron separadas en condiciones desnaturalizantes (ver anexo 8), posteriormente fueron transferidas a una membrana PVDF (Polyvinylidene fluoride de la marca Amersham Biosciencias) (ver anexo 10). La membrana fue incubada con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal VHC NS5A (dilución 1:1000; Biodesign International), anti-actina (dilución 1:1000; MP Biomedicals), anti-COX-2 (dilución 1:500; Cayman) y el anticuerpo policlonal: anti-NPT-II (dilución 1:1000; Cortex Biochem), a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-ratón y anti-conejo (1:1000; Promega) conjugado con peroxidasa de rábano (ver anexo 11), los cuales se incubaron durante 2 h a 4°C , la reacción visualizada con un kit de Quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotechnology) (ver anexo 12).

5.5.6 Niveles intracelulares de PGE_2

Para evaluar la actividad de la enzima COX-2 se midieron los niveles intracelulares de prostaglandinas E_2 (PGE_2), debido a que esta enzima cataliza la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina E_2 . La cuantificación se realizó en células Huh-7 replicón sin tratamiento (células control) y en células con tratamiento (Diclofenaco, Salicilato de Sodio e Indometacina a las distintas concentraciones) a diferentes tiempos 24, 48 y 72 h. La cuantificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

1. Las células Huh-7 fueron sembradas en una placa de 96 pozos a una concentración de 1×10^4 células.
2. Al día siguiente las células fueron expuestas a distintos tratamientos, excepto las células control a las cuales solo se les realizó un cambio de medio.
3. Se incubó las células durante 24, 48 y 72 h.
4. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se adicionó a cada pozo 100 μl de buffer de lisis 1 del kit para cuantificar PGE_2 . Se mezcló vigorosamente durante 1 h (aprox.); para facilitar la lisis celular se raspó con la ayuda de una puntilla.
5. Se observó al microscopio si las células fueron lisadas.

6. Se colocaron 50 μ l de lisado celular en cada pozo de la placa de 96 pozos (ver anexo 14), para realizar la cuantificación.

5.6 Estrategia general Estudio *in vivo*

Para cumplir con los objetivos 3, 4 y 5 (estudio *in vivo*) se llevo a cabo la siguiente estrategia general (Figura 18).

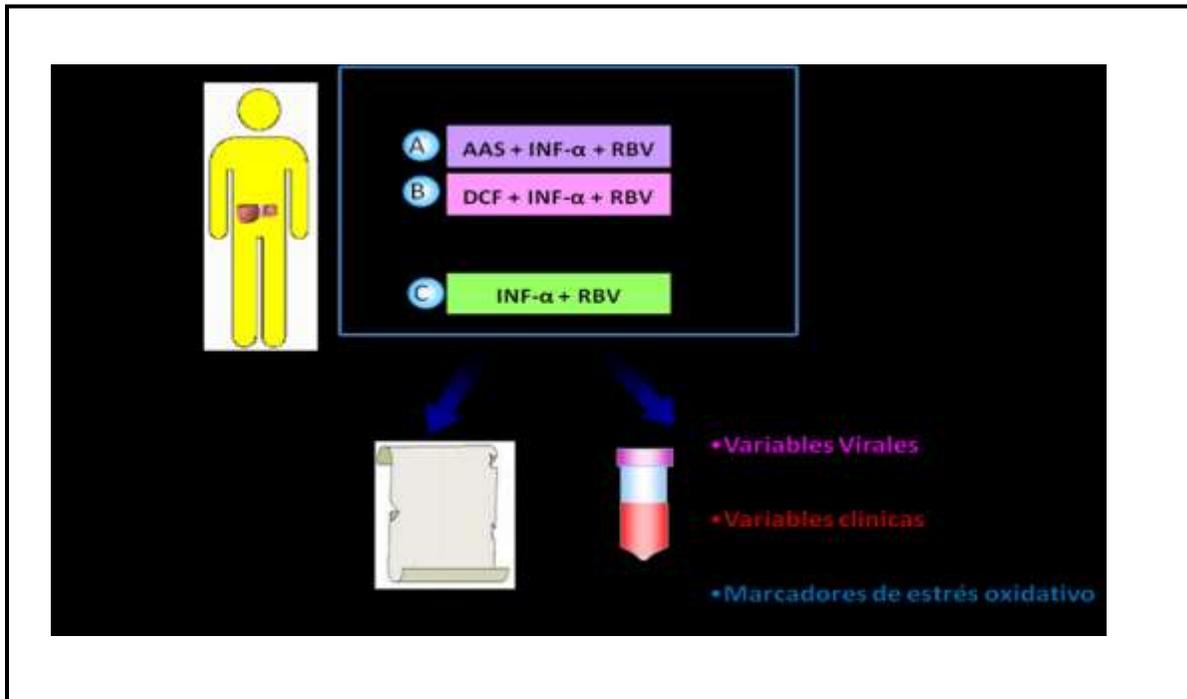


Figura 22. Estrategia general ensayo *in vivo*

Se reclutaron pacientes con Hepatitis C crónica que acudieron a Unidad de Hígado del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.6.1 Criterios de Inclusión y Exclusión del estudio *in vivo*

- **Criterios de Inclusión**

- Mayores de 18 años.
- VHC positivos por serología y PCR cuantitativa.
- Pacientes que acepten participar en el protocolo clínico.
- Pacientes que no posean contraindicaciones contra los AINES.

- **Criterios de Exclusión**

- Menores de 18 años.
- Pacientes coinfectados con VIH.
- Pacientes que sufran depresión.
- Con hemocromatosis.
- Con diabetes descontrolada.
- Con úlcera péptica.
- Con Gastropatía hipertensiva severa.
- Con enfermedad renal.
- Con hipertensión no controlada.
- Mujeres embarazadas.
- Consumo de alcohol.
- Que posean contraindicaciones para los AINES.

Una vez que los pacientes ingresaron al protocolo clínico se asignaron al azar en uno de los tres esquemas de tratamiento:

A: El grupo A incluyó pacientes que recibieron como tratamiento Aspirina más la terapia estándar interferón alfa pegilado y ribavirina (INF-PEG α + RBV)

B: El grupo B incluyó pacientes que recibieron como tratamiento Diclofenaco más la terapia estándar (INF-PEG α + RBV).

C: El grupo C incluyó pacientes que recibieron como tratamiento únicamente la terapia estándar INF-PEG α + RBV (grupo control).

5.6.2 Fases del tratamiento con AINES



Figura 19. Esquema de tratamiento para pacientes del grupo A y B.

El tratamiento tuvo una duración de dos meses, este se dividió en cuatro fases:

Fase 1 o basal: Tuvo una duración de dos semanas en donde el paciente no recibió tratamiento con la finalidad de ver las condiciones iniciales en las que se encontraba. Se realizó toma de muestra sanguínea el primer día de ingresar al protocolo (día 0), durante los tres días posteriores (día 1, 2 y 3), a la semana (día 7) y previo a iniciar el tratamiento (a las dos semanas, día 14). En cada una de las muestras se determinaron las variables anteriormente mencionadas (Fig. 19).

Fase 2 o AINES: Tuvo una duración de dos semanas en donde el paciente recibió como tratamiento el AINES (Aspirina o Diclofenaco) como monoterapia. Se realizó toma de muestra sanguínea 24 h post-tratamiento (día 15), durante los dos días posteriores de tratamiento (día 16 y 17), a la semana (día 21) y a las dos semanas de tratamiento (día 28). En cada una de las muestras se determinaron las variables anteriormente mencionadas (Fig. 19).

Fase 3 o Aclaramiento: Tuvo una duración de una semana en donde el paciente no recibió tratamiento, con la finalidad de que elimine el fármaco (diclofenaco o aspirina) en sangre.

Fase 4 o Terapia combinada: Tuvo una duración de dos semanas en donde el paciente recibió como tratamiento la terapia estándar (INF-PEG α + RBV) en combinación con el AINES (Aspirina o Diclofenaco).

Se realizó toma de muestra sanguínea previo a iniciar la terapia combinada (día 36), y durante los tres días posteriores de tratamiento (37, 38 y 39), a la semana (día 43) y a las dos semanas (día 50); siendo este el último día de tratamiento. En cada una de las muestras se determinaron las variables anteriormente mencionadas (Fig. 19).

5.6.3 Fases del tratamiento estándar INF-PEG α + RBV

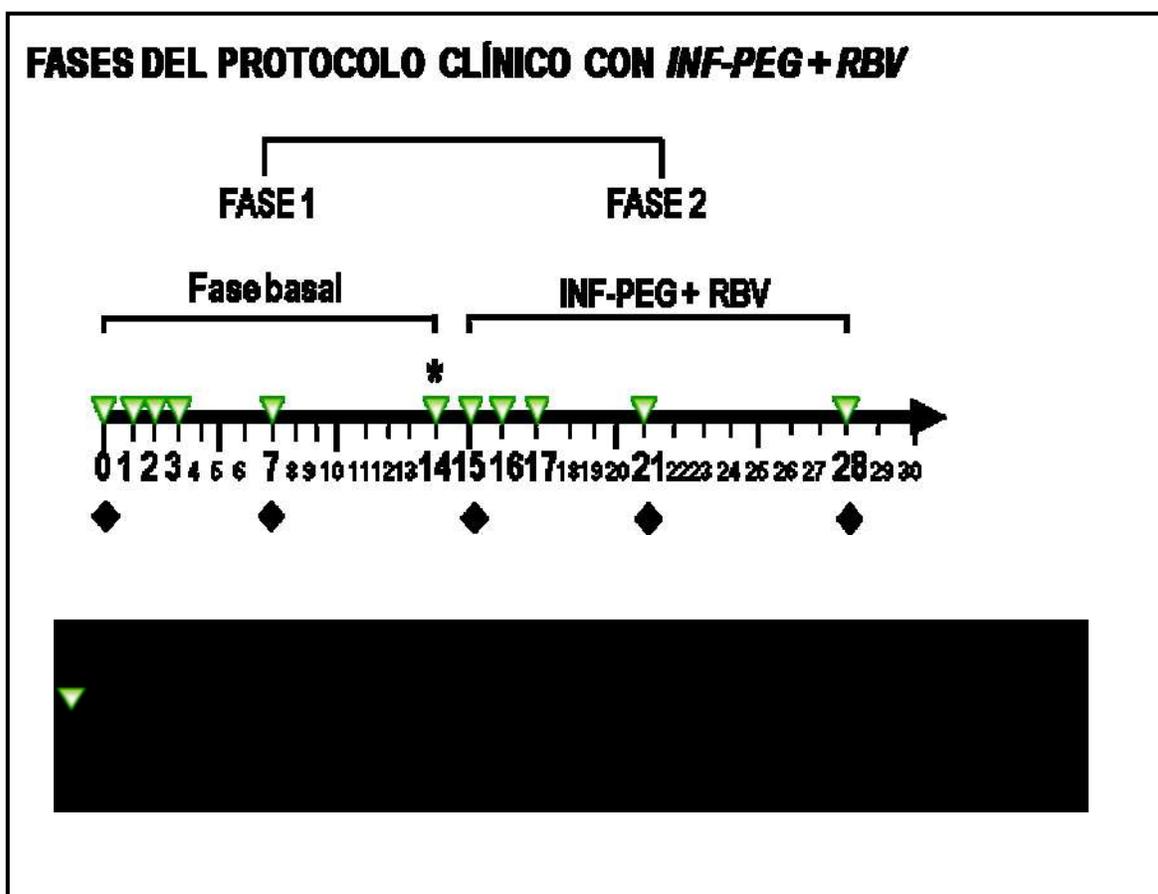


Figura 20. Esquema de tratamiento para pacientes del grupo C

Fase 1 o basal: Tuvo una duración de dos semanas en donde el paciente no recibió tratamiento con la finalidad de ver las condiciones iniciales en las que se encontraba. Se realizó toma de muestra sanguínea el primer día de ingresar al protocolo (día 0), durante los tres días posteriores (día 1, 2 y 3), a la semana (día 7) y previo a iniciar el tratamiento (día 14). En cada una de las muestras se determinaron las variables anteriormente mencionadas (Fig. 19).

Fase 2 o AINES: Tuvo una duración de dos semanas en donde el paciente recibió como tratamiento la terapia estándar (INF-PEG α + RBV). Se realizó toma de muestra sanguínea durante los tres días posteriores de iniciado el tratamiento estándar (día 15, 16 y 17) a la semana (día 21) y a las dos semanas de tratamiento (día 28). Se analizaron las variables mencionadas (Fig 19) durante estos días.

5.6.4 Evaluación de efectos adversos

Se les realizó un cuestionario a los pacientes para evaluar los efectos adversos que se presentaron durante el tratamiento con AINES (ver anexo 10.12), El cuestionario incluye síntomas característicos de pacientes que reciben tratamiento con la terapia estándar (Fig 21).

	Astenia, fiebre, escalofríos, cefalea, etc.
	Nausea, Vómito, Diarrea, etc.
	Prurito, Rash y Alopecia.
	Dism. de atención, concentrarse, ansiedad, etc.
	Trombocitopenia, Anemia y Leucopenia
	Inf. Bacterianas, tx autoinmunes y pérdida de peso

Figura 21. Esquema de los efectos adversos evaluados en los pacientes.

5.6.8 Extracción de RNA viral de pacientes VHC positivos.

Se llevo a cabo la extracción del RNA viral a partir de plasma por medio de las columnas QIAamp UltraSens Virus Kit de la marca QIAGEN, siguiendo las indicaciones del kit (ver anexo 19), una vez realizada la extracción el RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.6.9 Determinación de carga viral del VHC por RT-qPCR.

Para la cuantificación absoluta se construyó una curva para ello se realizaron diluciones de 10 a 20,000,000 copias/ml del plásmido pFK1₃₉₈-NS3-3' replicón; el cual expresa las proteínas no estructurales (ver anexo 22), con base a ello se determinó la ecuación de la recta (Fig. 34).

La cuantificación se llevo a cabo en dos pasos:

- **Paso 1. Síntesis de cDNA**

Una vez realizada la extracción de RNA viral a partir de plasma, este fue sujeto a retrotranscripción. Se preparó la siguiente mezcla de reacción (Cuadro 15).

Cuadro 15. Condiciones de reacción para la RT

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen por reacción	Concentración Final
Buffer RT	10X	2 µl	1X
dNTPs	25X	0.8 µl	1X
Random Primer	10X	2 µl	1X
Enzima MultiScribe RT	50 U/µl	1 µl	2.5 U
Agua DEPC	-----	4.2 µl	-----
RNA	-----	3 µl	-----
Volumen final		20 µl	

El programa para la retrotranscripción fue el siguiente (Cuadro 16)

Cuadro 16. Programa de reacción para la RT

Tiempo	Temperatura °C
10 min	25
2 h	37

• **Paso II. PCR en Tiempo Real**

Una vez obtenido el cDNA se prosiguió a realizar la PCR, para ello se utilizaron los iniciadores: 5'-GCG TCT AGC CAT GGC GTT A-3' (Forward) y 5'-GGT TCC GCA GAC CAC TAT GG-3' (Reverse), los cuales se alinean en la región 5'UTR del VHC. La sonda Taqman utilizada fue 5'-FAM- CTG CAC GAC ACT CAT AC-NFQ-3'. Las condiciones de reacción se mencionan en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen por reacción	Concentración final
TaqMan Universal PCR master mix	2X	12.5 µl	1X
Ensayo de HCV o GAPDH	20X	1.25 µl	1X
cDNA diluido en agua DEPC	-----	11.25 µl	-----
Total		25 µl	

Para la dilución de la muestra se colocaron 5 µl de cDNA más 6.25 µl de agua DEPC.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Cuadro 18).

Cuadro 18. Condiciones de reacción para la PCR en tiempo real

Tiempo	Temperatura °C
2 min	50
10 min	95
15 seg	95
1 min	60

5.6.10 Determinación de TBARS a partir de Suero.

A partir de 500 µl de suero se realizó la extracción de los lípidos LDL y VLDL (ver anexo 15) una vez realizada la extracción de lípidos, esta muestra se utiliza para realizar el ensayo de TBARS el se realizó mediante el kit Thiobarbituric acid reactive substances de Oxitek. Para realizar el ensayo todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de comenzar y encender el baño maría a 95°C. Para la preparación de los estándares y de los reactivos ver anexo 10.4.1

1. Se etiquetaron tubos de ensaye de 15 x 1.5 cm tanto para las muestras como para los estándares.
2. Se colocaron 100 µl de la muestra o del estándar en cada uno de los tubos.
3. Se adicionaron 100 µl de la solución de SDS a cada tubo y se mezcló agitando el tubo.
4. Posteriormente se colocaron 2.5 ml del buffer TBA en el fondo de cada tubo.
5. Después se tapo el tubo con una canica se incubo a 95°C durante 60 minutos.
6. Una vez incubada la muestra las muestras se colocaron en hielo durante 10 minutos.
7. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos.
8. Se removió el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo para el análisis.

9. Para el análisis de fluorescencia se utilizó una longitud de onda de excitación de 530 nm y una de emisión de 550 nm.
10. Los datos se analizaron de acuerdo a las indicaciones del anexo 15

5.6.11 Cuantificación de SOD a partir de Suero.

La determinación se realizó utilizando el kit Superoxide Dismutase Assay de Cayman. Para la preparación de los reactivos y estándares ver anexo 16.

1. Todos los reactivos se equilibraron a temperatura ambiente (a excepción la xantina oxidasa), antes de comenzar el ensayo.
2. Tanto las muestras como los estándares se realizaron por duplicado.
3. Se prepararon los estándares siguiendo las indicaciones del anexo 16
4. A cada uno de los pozos que se van a utilizar de la placa de 96 se colocaron 200 µl del radical detector diluido.
5. Posteriormente se colocaron 10 µl de los estándares.
6. Se colocaron 10 µl de la muestra.
7. Se adicionaron 20 µl de la xantina oxidasa diluida a cada uno de los pozos (se anotó el tiempo y se hizo lo más rápido posible).
8. Se cubrió la placa y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.
9. La absorbancia se leyó a 450 nm utilizando un espectrofotómetro en placa.
10. Los datos se analizaron de acuerdo a las indicaciones del anexo 16

5.6.12 Cuantificación de Gpx a partir de Plasma.

La determinación se realizó utilizando el kit Glutathione peroxidase assay kit de Oxitek. Para la preparación de los reactivos ver anexo 17

1. Todos los reactivos se equilibraron a temperatura ambiente antes de realizar el ensayo.
2. Se encendió el espectrofotómetro de celda 15 minutos a 340 nm antes de comenzar.
3. Se colocó el blanco el cual fue agua desionizada.
4. En la cubeta se colocaron 870 µl de la solución de trabajo A.
5. Se adicionaron 60 µl de la solución de comienzo.

6. Una vez realizado esto se adició a la reacción 30 µl de la muestra.
7. Se mezcló bien la reacción y se contó el tiempo.
8. Se leyó la absorbancia a 340 nm al tiempo cero (40 segundos después de haber colocado la muestra).
9. Una vez más la muestra se leyó a 340 nm al minuto.
10. Los cálculos se realizaron de acuerdo al anexo 17.

5.6.13 Determinación del Genotipo del VHC.

Una vez realizado el aislamiento del RNA (previamente extraído por columna) se sometió a RT utilizando la enzima MMLV (ver anexo 21) una vez obtenido el cDNA se realizó el primer ciclo de PCR (cuadro 19)

- **PCR 1**

Cuadro 19. Condiciones de reacción para la PCR 1 del genotipo

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer PCR 10x	10X	5 µl	1X
Primer OP	20X	10 µl	4X
dNTP	2.5 mM	4 µl	0.2 mM
Taq polimerasa	5 U/ µl	0.2 µl	1 U
cDNA diluido en agua DEPC	-----	5 µl	-----
Agua DEPC	-----	25.8 µl	-----
Total		50 µl	

Cuadro 20. Condiciones de reacción para la PCR 1 del genotipo

Tiempo	Temperatura °C
1 min	94
15 seg	94
30 seg	55
30 seg	72
5 min	72

} 40 veces

Posteriormente se procedió a realizar la segunda amplificación por PCR siguiendo las condiciones mostradas en el cuadro 21

- **PCR 2**

Cuadro 21. Condiciones de reacción para la PCR 2 del genotipo

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer PCR 10x	10X	5 µl	1X
Primer NP	20X	10 µl	4X
dNTP	2.5 mM	4 µl	0.2 mM
Taq polimerasa	5 U/ µl	0.2 µl	1 U
Producto amplificado PCR 1	-----	1 µl	-----
Agua DEPC	-----	29.8 µl	-----
Total		50 µl	

Cuadro 22. Condiciones de reacción para la PCR 2 del genotipo

Tiempo	Temperatura °C
1 min	94
15 seg	94
30 seg	55
30 seg	72
5 min	72

} 40 veces

• **Análisis de Resultados**

Para corroborar la producción de los amplicones utilizando los primers del kit se preparó un gel de agarosa al 2%. Se cargaron 10 µl de cada uno de los productos amplificados de la PCR 2 así como sus respectivos controles negativos y el control positivo que en este caso es el control gel (el cual viene incluido con el kit). Los amplicones deben aparecer como banda única con las siguientes longitudes aproximadamente:

Amplicón	Longitud pares de bases (pb)
PCR 1	300 pb
PCR 2	240 pb
Control gel	275 pb

- **Hibridación del producto amplificado con las tiras**

1. Los reactivos y las tiras de análisis se dejaron a temperatura ambiente aprox. 30 minutos antes de comenzar.
2. Previamente se encendió el baño maría a 55°C.
3. Las tiras se manipularon exclusivamente con las pinzas y se marcaron con lápiz para identificar las distintas muestras.
4. Se colocaron las soluciones HYBRIDZ SOLN y STRIN WASH SOLN en un baño maría (a no más de 50°C) con la finalidad de disolver los cristales.
5. Se añadieron 10 µl de la solución DENAT SOLN en la esquina superior de cada pocillo.
6. Posteriormente se adicionaron 10 µl de muestra o control negativo a la solución DENAT SOLN en cada pocillo. Se mezcló pipeteando arriba y abajo.
7. Se incubó durante 5 minutos.
8. Se adicionaron 2 ml de solución HYBRIDZ SOLN a cada pocillo, se agitó suavemente cada pocillo.
9. Se colocó la bandeja en un baño maría a 55°C con agitación y se incubó durante 60 minutos.
10. Se aspiró la solución del pocillo con una pipeta.
11. Después se añadieron 2 ml de solución STRIN WASH SOLN a cada pocillo durante 10 segundos.
12. Se repitió el lavado una vez siguiendo las indicaciones del paso 11.
13. Se colocaron 2 ml de solución STRIN WASH SOLN a cada pocillo y se incubó en baño maría durante 30 minutos en agitación.
14. Previamente se prepararon 8 ml de solución de aclarado para cada pocillo y 10 ml adicionales. Se diluyó la solución CONJ 100x 1:100 con el diluyente CONJ DIL.
15. Una vez terminado el tiempo de incubación se extrajo la bandeja del baño maría se aspiró la solución de cada pocillo.
16. Se adicionaron 2 ml de la solución de aclarado diluida a cada pocillo y se lavó la tira durante 1 minuto a temperatura ambiente.
17. Se aspiró la solución y se repitió el paso 16.
18. Una vez realizado esto se adicionaron 2 ml de conjugado diluido y se colocó la bandeja en un agitador a temperatura ambiente y se incubó durante 30 minutos.
19. Se prepararon 2 ml de sustrato diluido para cada pocillo y 2 ml adicionales. El sustrato SUBS PCIP/NBT 100x 1:100 en SUBS BUF.

20. Se añaden 2 ml de solución de aclarado diluida a cada pocillo y se lavo la tira agitando la bandeja.
21. Se repitió el paso 20.
22. Se colocaron 2 ml de SUBS BUF a cada pocillo y se lavo la tira agitando la bandeja durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se aspiró la solución de cada pocillo.
23. Se adicionaron 2 ml de sustrato diluido a cada pocillo, se colocaron en un agitador a temperatura ambiente y se incubaron durante 30 minutos.
24. Una vez terminada la incubación, se aspiró la solución de cada pocillo, se colocaron 2 ml de agua destilada durante 3 minutos.
25. Se repitió el paso 24.
26. Se secó la tira y se determino el genotipo del paciente con base en el patrón de bandeado (ver anexo 27)

VI. RESULTADOS

6.1 Efecto de los AINES (DCF, SaNa e Indo) en los niveles del RNA viral en las células Huh-7 VHC replicón.

Para evaluar el efecto de los AINES en los niveles del RNA del VHC, las células Huh-7 replicón fueron expuestas a concentraciones crecientes de diclofenaco (50-150 μ M), salicilato de sodio (2-6 mM) e indometacina (50-150 μ M) durante 24, 48 y 72 h, como control negativo se utilizaron células replicón sin tratamiento. Al finalizar el tiempo de incubación se hizo la extracción de RNA total que fue sujeto a RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

El tratamiento con Diclofenaco disminuyó los niveles del RNA viral a las 24 y 48 horas pos-tratamiento, comparado con las células sin tratamiento (Fig 22).

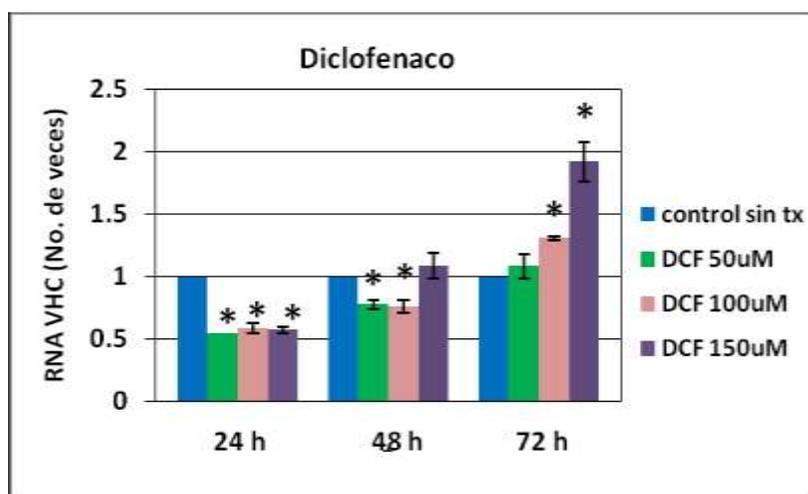


Figura 22. Efecto del diclofenaco en los niveles del RNA viral: 2×10^5 células Huh7 replicón sembradas en placas de 6 pozos fueron tratadas con diclofenaco (50-150 μ M) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h. Posttratamiento los niveles del RNA viral fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Los niveles del RNA del VHC fueron normalizados con base a la relación VHC/GAPDH RNAm. Los resultados están expresados como niveles del RNA del VHC (número de veces) con respecto al control (células sin tratamiento) que se define como 1.0. Los valores representan el promedio \pm DS de tres experimentos y en cada uno de ellos se incluyeron tres réplicas (* $P < 0.01$).

El tratamiento con Salicilato de sodio disminuyó los niveles de RNA viral a los tres tiempos pos-tratamiento, comparado con las células sin tratamiento. Siendo este efecto antiviral más evidente a las 24 horas. (Fig 23).

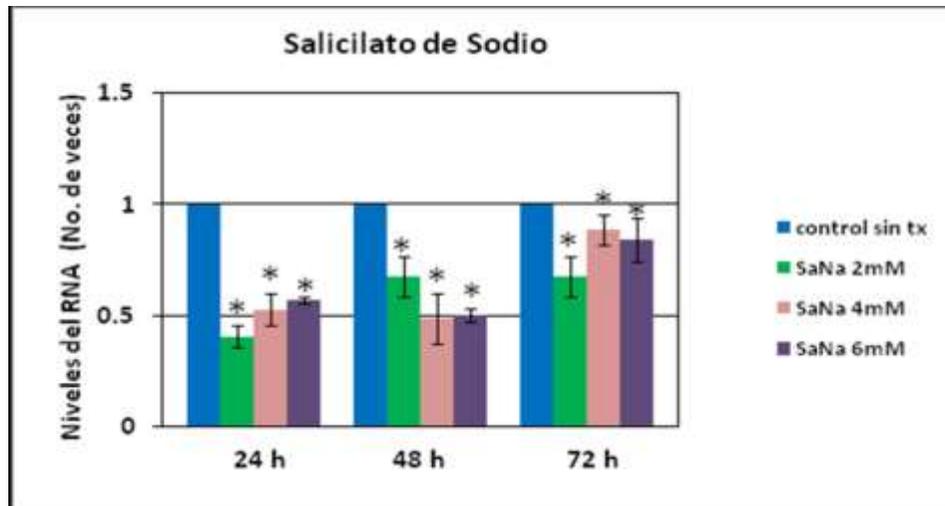


Figura 23. Efecto del salicilato de sodio en los niveles del RNA viral: 2×10^5 células Huh7 replicón sembradas en placas de 6 pozos fueron tratadas con salicilato (2-6 mM) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h. Postratamiento los niveles del RNA viral fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Los niveles del RNA del VHC fueron normalizados con base a la relación VHC/GAPDH RNAm. Los resultados están expresados como niveles del RNA del VHC (número de veces) con respecto al control (células sin tratamiento) que se define como 1.0. Los valores representan el promedio \pm DS de tres experimentos y en cada uno de ellos se incluyeron tres réplicas (* $P < 0.01$).

El tratamiento con Indometacina disminuyó los niveles de RNA viral a las 24 h postratamiento, al ser comparado con las células sin tratamiento (Fig 24).

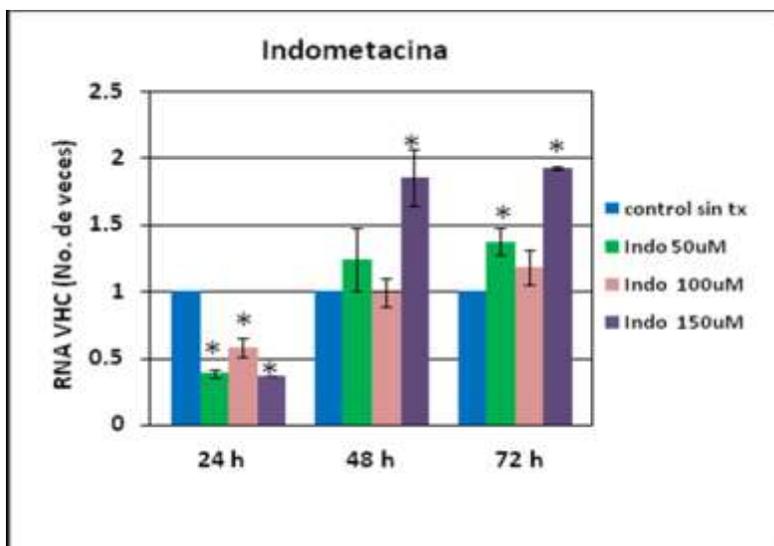


Figura 24. Efecto de la indometacina en los niveles del RNA viral: 2×10^5 células Huh7 replicón sembradas en placas de 6 pozos fueron tratadas con indometacina (50-150 μ M) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h. Postratamiento los niveles del RNA viral fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Los niveles del RNA del VHC fueron normalizados con base a la relación VHC/GAPDH RNAm. Los resultados están expresados como niveles del RNA del VHC (número de veces) con respecto al control (células sin tratamiento) que se define como 1.0. Los valores representan el promedio \pm DS de tres experimentos y en cada uno de ellos se incluyeron tres réplicas (* $P < 0.01$).

6.2 Evaluación de la toxicidad de los AINES (diclofenaco, salicilato de sodio e indometacina) en las células Huh-7 VHC Replicón.

Para confirmar que las concentraciones de los distintos AINES que se estaban utilizando no fueran tóxicas para las células, se hizo un ensayo de viabilidad celular con el reactivo azul alamar. La concentración de 200 μ M de diclofenaco provocó muerte celular, mientras que las concentraciones de 50-150 μ M no fueron tóxicas para las células (Fig 25). La concentración de 8 mM de salicilato de sodio provocó muerte celular, mientras que las concentraciones de 2-6 mM no fueron tóxicas para las células (Fig 26). Para el caso de la indometacina la concentración de 200 μ M presentó un efecto citotóxico mientras que las concentraciones de 50-150 μ M no fueron tóxicas para las células (Fig 27).

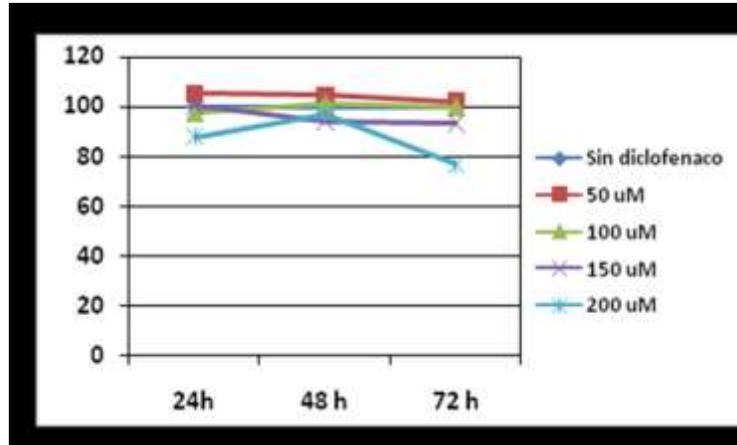


Figura 25. Evaluación de la toxicidad del diclofenaco en las células Huh-7 VHC replicón: 1×10^4 células Huh7 replicón sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con diclofenaco (50-150 μM) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h pos-tratamiento. Se determinó el porcentaje de células vivas y se comparó con las células no tratadas (100% de viabilidad). Se hicieron tres réplicas de cada condición.

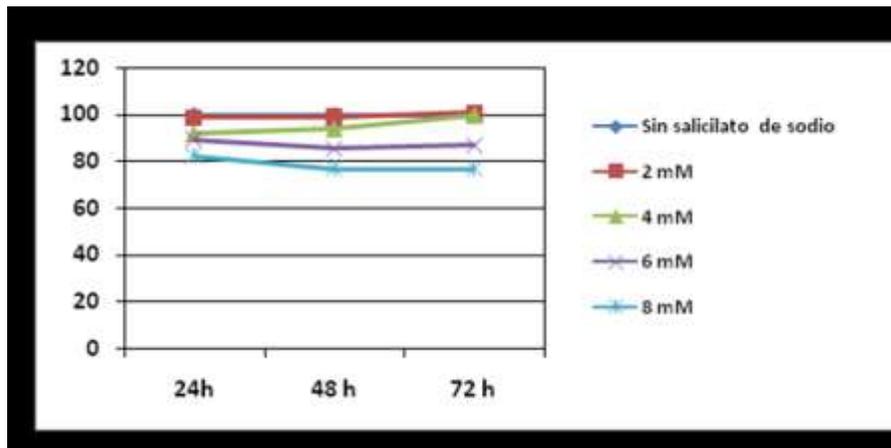


Figura 26. Evaluación de la toxicidad del salicilato de sodio en las células Huh-7 VHC replicón: 1×10^4 células Huh7 replicón sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con salicilato de sodio (2-6 mM) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h pos-tratamiento. Se determinó el porcentaje de células vivas y se comparó con las células no tratadas (100% de viabilidad). Se hicieron tres réplicas de cada condición.

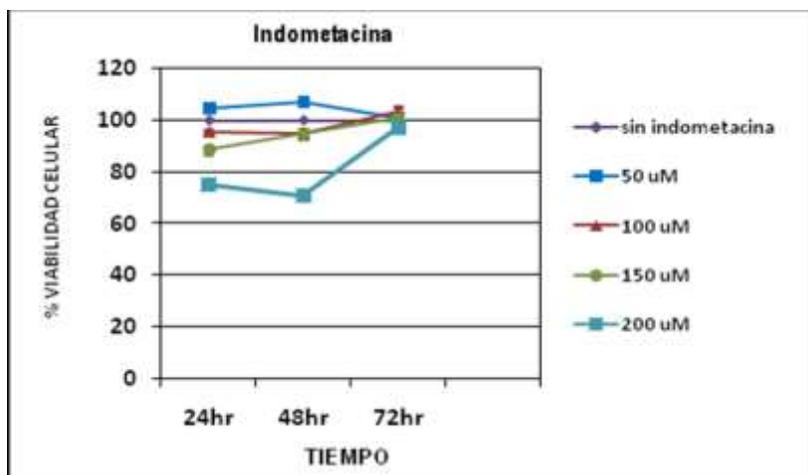


Figura 27. Evaluación de la toxicidad de la indometacina en las células Huh-7 VHC replicón: 1×10^4 células Huh7 replicón sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con indometacina (50-150 μM) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h pos-tratamiento. Se determinó el porcentaje de células vivas y se comparó con las células no tratadas (100% de viabilidad). Se hicieron tres replicas por condición.

6.3 Evaluación del efecto de los AINES en la expresión de las proteínas celulares y no estructurales del VHC.

También, se estudió si los AINES disminuían la expresión de las proteínas no estructurales del VHC por lo que detectamos a la proteína NPT-II del replicón del VHC. Para tal propósito las células Huh7 VHC Replicón fueron incubadas en presencia o ausencia de diclofenaco (50-150 μM) durante 24, 48 y 72 h. Al término de cada tiempo de exposición las células fueron cosechadas y se extrajeron las proteínas totales que fueron sujetas a western blot. Se observó que el diclofenaco aumentó hasta 1.82 veces los niveles de la proteína NPT-II comparados con las células Huh7 replicón sin tratamiento, y este efecto fue dependiente de la concentración (Fig. 28). EN conjunto estos resultados sugieren que el diclofenaco tuvo un efecto negativo en los niveles del RNA viral a las 24 y 48 h pos-tratamiento; sin embargo este efecto pierde a las 72 h pos-tratamiento al aumentar los niveles del RNA viral y de la proteína NPT-II.

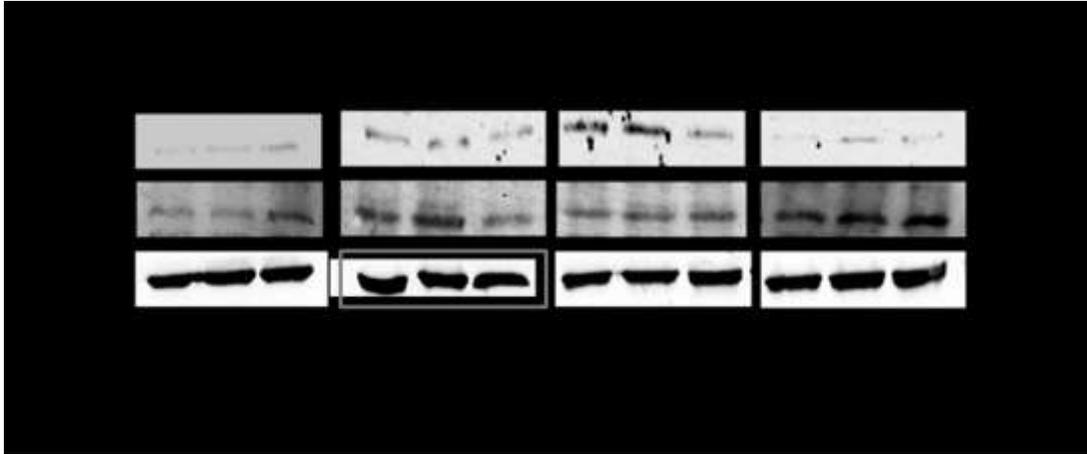


Figura 28. Efecto del diclofenaco en los niveles de la proteína del replicón del VHC: 1×10^6 células Huh7 replicón sembradas en placas de 35 x 10 mm pozos fueron tratadas con diclofenaco (50-150 μ M) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h pos-tratamiento. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el western blot para detectar los niveles de la proteína NPT-II, COX-2 y actina. La relación de las proteínas fue semicuantificada con el programa Phoretix/1D versión 2003.02

Por otra parte, las células Huh7 VHC Replicón fueron incubadas en presencia o ausencia de salicilato de sodio (2-6 mM) durante 24, 48 y 72 h. Al término de cada tiempo de exposición las células fueron cosechadas y se extrajeron las proteínas totales que fueron sujetas a western blot. Se observó que el salicilato de sodio disminuyó hasta 0.60 veces los niveles de la proteína NPT-II comparado con las células Huh7 replicón sin tratamiento; este efecto fue dependiente de la concentración (Fig. 29). En conjunto estos resultados sugieren que el salicilato tuvo un efecto negativo en los niveles del RNA viral así también en los niveles de la proteína NPT-II.

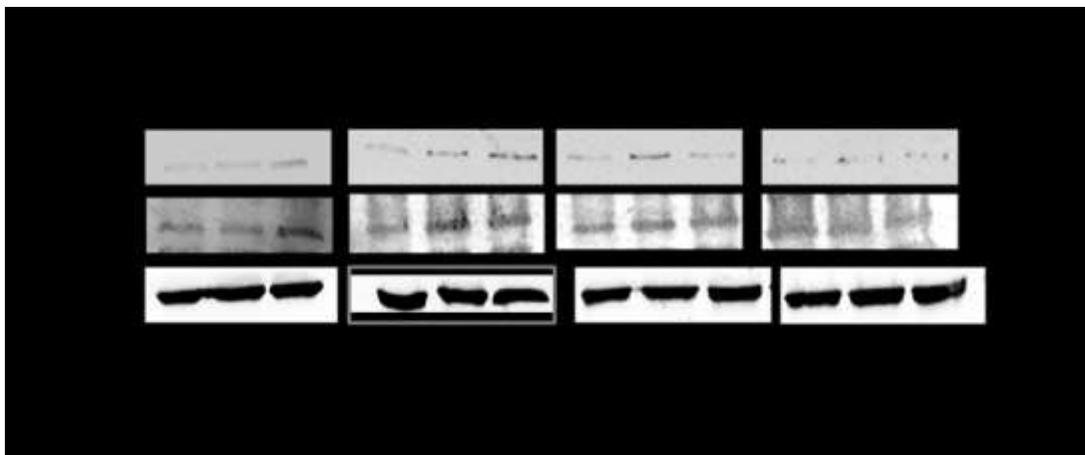


Figura 29. Efecto del salicilato de sodio en los niveles de la proteína del replicón de VHC: 1×10^6 células Huh7 replicón sembradas en placas de 35 x 10 mm pozos fueron tratadas con salicilato (2-6 mM) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h pos-tratamiento. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el western blot para detectar los niveles de la proteína NPT-II, COX-2 y actina. La relación de las proteínas fue semicuantificada con el programa Phoretix/1D versión 2003.02

Las células Huh7 VHC Replicón también fueron incubadas en presencia o ausencia de indometacina (50-150 μ M) durante 24, 48 y 72 h. Al término de cada tiempo de exposición las células fueron cosechadas y se extrajeron las proteínas totales que fueron sujetas a western blot. Se observó que la indometacina aumentó hasta 2.42 veces los niveles de la proteína NPT-II comparados con las células Huh7 replicón sin tratamiento; este efecto fue dependiente de la concentración (Fig. 30). En conjunto estos resultados sugieren que la indometacina tuvo un efecto negativo en los niveles del RNA viral durante las 24 pos-tratamiento; sin embargo se presentó un efecto positivo en los niveles de la proteína NPT-II.

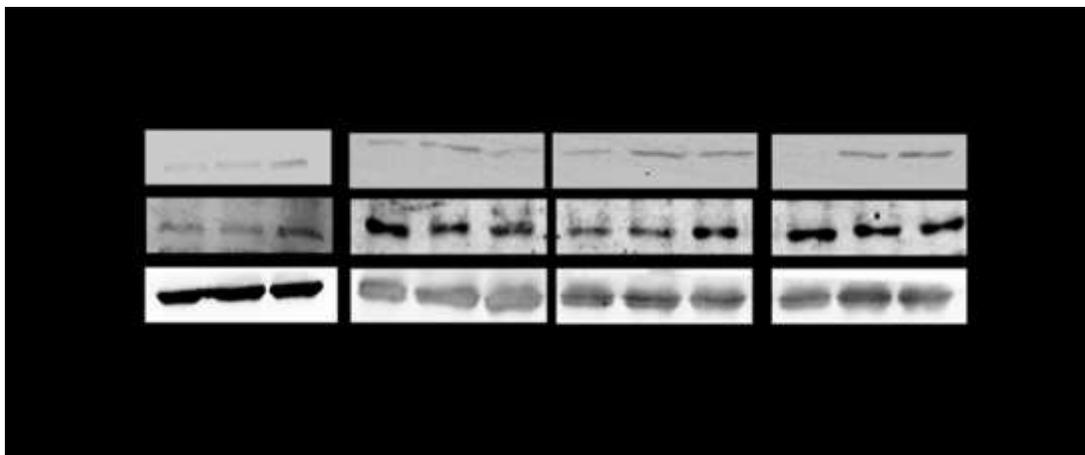


Figura 30. Evaluación de la indometacina en los niveles de la proteína del replicón de VHC: 1×10^6 células Huh7 replicón sembradas en placas de 35 x 10 mm pozos fueron tratadas con indometacina (50-150 μ M) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h pos-tratamiento. Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el western blot para detectar los niveles de la proteína NPT-II, COX-2 y actina. La relación de las proteínas fue semicuantificada con el programa Phoretix/1D versión 2003.02

Se ha reportado que la expresión de las proteínas no estructurales (NE) del VHC promueven la expresión de COX-2 a nivel de proteína y actividad transcripcional debido al aumento de prostaglandinas (PGE_2)⁵⁵.

Por lo consiguiente, para evaluar si el efecto negativo de los AINES (el cual se observó a las 24 y 48 h pos-tratamiento para el diclofenaco y a las 24 h pos-tratamiento para el caso de la indometacina) estaba mediado por la actividad enzimática de COX-2; enzima que juega un papel importante en la replicación del VHC, se evaluaron los niveles de esta proteína. Las células Huh-7 replicón fueron tratadas en presencia o ausencia de diclofenaco (50-150 μ M), salicilato de sodio (2-6 mM) o indometacina (50-150 μ M) durante 24, 48 y 72 horas. Pos-tratamiento se extrajeron las proteínas totales que fueron utilizadas en el western-blot. (50-150 μ M).

Se observó que el diclofenaco mostró una disminución de hasta 0.60 veces para la concentración de 150 μ M y un aumentó para la concentración de 100 μ M en los niveles de la proteína COX-2. Sugiriendo que este efecto parece ser independiente del efecto negativo del diclofenaco observado durante las 24 y 48 h postratameinto.

El salicilato de sodio mostró una disminución en los niveles de la enzima COX-2 efecto que parece estar asociado con la regulación negativa del VHC. En el caso de la indometacina se observó un aumento en los niveles de COX-2 a las concentraciones de 100 y 150 μM a partir de las 48 h pos-tratamiento así como una disminución para las tres concentraciones a las 24 h. Sugiriendo que este efecto está relacionado con el efecto negativo de la indometacina en los niveles del RNA viral observado a las 24 h pos-tratamiento para las concentraciones 50-150 μM .

6.4 Actividad enzimática de COX-2

Para evaluar si el efecto positivo o negativo en los niveles del RNA viral estaba asociado con la actividad enzimática de COX-2; así como también evaluar si cada uno de los AINES está llevando a cabo su función farmacológica (inhibición de la enzima COX-2) los niveles intracelulares de prostaglandina E_2 (PGE_2) fueron cuantificados. Para ello las células Huh7 VHC Replicón fueron tratadas con diclofenaco (50-150 μM), salicilato de sodio (2-6 mM) o indometacina (50-150 μM) durante 24, 48 y 72 h. Pos-tratamiento la producción de PGE_2 fue cuantificada por ELISA.

En el caso de diclofenaco (Fig. 31) observamos un efecto inhibitor de la actividad de COX-2 a partir de las 48 y 72 h pos-tratamiento. Sin embargo, este efecto parece no estar asociado con la regulación negativa del RNA del VHC. Este resultado confirma el mecanismo de acción del diclofenaco, que es bloquear la actividad enzimática de COX (COX-1/COX2), disminuyendo la producción de PGE_2 .

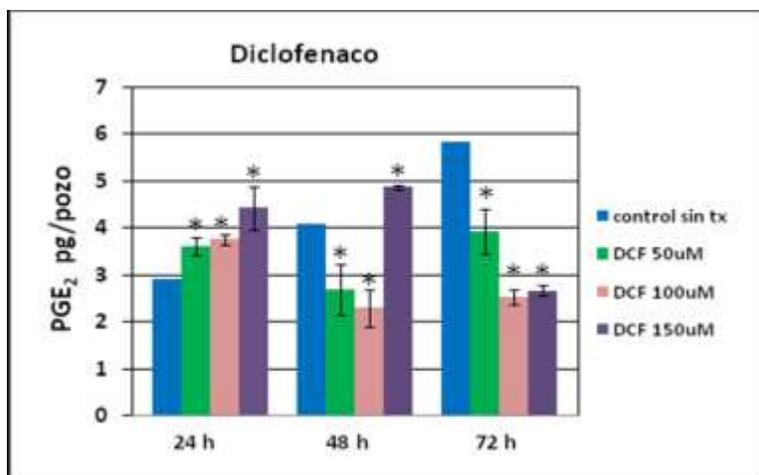


Figura 31. Efecto del diclofenaco en la actividad enzimática de COX-2 en las células Huh-7 VHC replicón: 1×10^4 células Huh7 replicón sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con diclofenaco (50-150 μ M) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h. Pos-tratamiento se cuantificaron los niveles intracelulares de PGE₂ con un kit de ELISA de la marca Amershan Biosciences. Los valores representan el promedio \pm SD de tres replicas.

En el caso de salicilato de sodio (Fig. 32) observamos un efecto inhibitor de la actividad de COX-2 a partir de las 48 h y 72 h pos-tratamiento, así como también una disminución en los niveles de la enzima COX-2 (Fig. 29). Efectos que parecen estar asociados con la regulación negativa del RNA del VHC inducido por salicilato. Este resultado confirma el mecanismo de acción del salicilato de sodio, que es bloquear la actividad enzimática de COX (COX-1/COX2), lo que disminuye la producción de PGE₂.

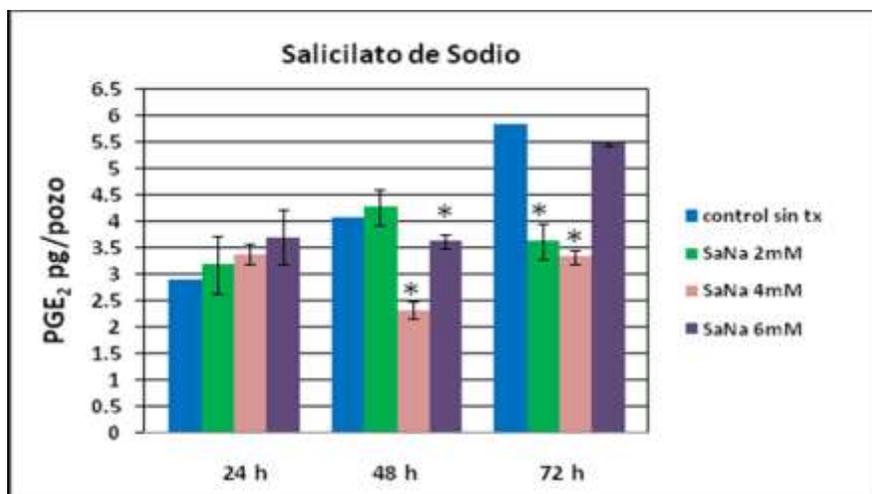


Figura 32. Efecto del salicilato de sodio en la actividad enzimática de COX-2 en las células Huh-7 VHC replicón: 1 x 10⁴ células Huh7 replicón sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con salicilato de sodio (2-6 μM) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h. Pos-tratamiento se cuantificaron los niveles intracelulares de PGE₂ con un kit de ELISA de la marca Amershan Biosciences. Los valores representan el promedio ± SD de tres replicas.

En el caso de indometacina (Fig. 33) observamos un efecto inhibitor de la actividad de COX-2 a partir de las 48 h y 72 h pos-tratamiento. Sin embargo, este efecto que parece no estar asociado con la regulación negativa del RNA del VHC. Este resultado confirma el mecanismo de acción de la indometacina, que es bloquear la actividad enzimática de COX (COX-1/COX2), lo que disminuye la producción de PGE₂.

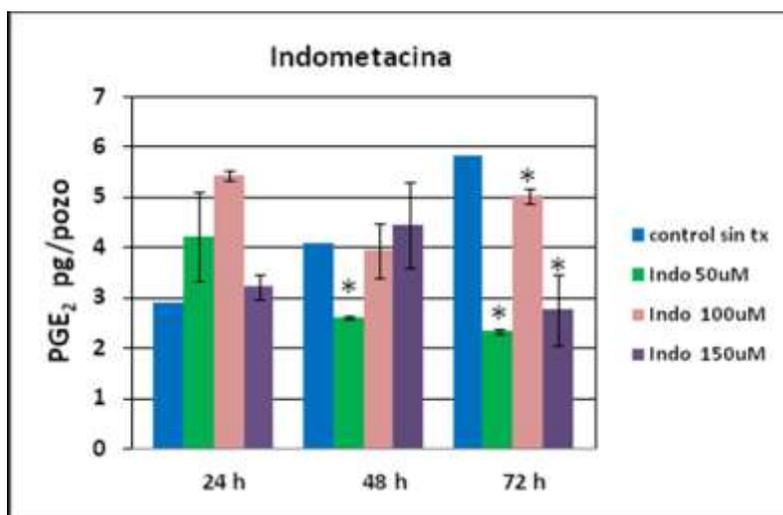


Figura 33. Efecto de la indometacina en la actividad enzimática de COX-2 en las células Huh-7 VHC replicón: 1 x 10⁴ células Huh7 replicón sembradas en placas de 96 pozos fueron tratadas con indometacina (50-150 μM) o sin tratamiento durante 24, 48 y 72 h. Pos-tratamiento se cuantificaron los niveles intracelulares de PGE₂ con un kit de ELISA de la marca Amershan Biosciences. Los valores representan el promedio ± SD de tres replicas.

6.5 Desarrollo e implementación de un método para la cuantificación de la carga viral

Para la determinación de la carga viral de los pacientes se desarrolló e implementó un método de PCR en tiempo real de cuantificación absoluta. Para preparar la curva estándar se utilizó el replicón de VHC pFKI₃₉₈-NS3-3'. Se prepararon diluciones del replicón en un rango de concentraciones de 10¹- 20⁷ copias/ml (Fig. 34). La sensibilidad de nuestro ensayo fue de 1000-20,000,000 copias/ml concordando con el rango dinámico reportado⁵⁸. Nuestro método fue sensible y reproducible, presentando un coeficiente de variación de 0.29-4.41%.

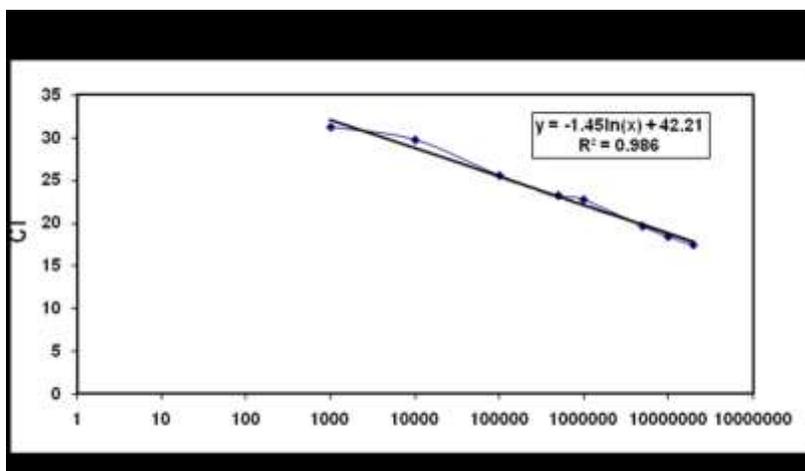


Figura 34. Curva estándar de VHC en PCR en tiempo real: Se analizaron diluciones de 10- 20,000,000 copias/ml del replicón de VHC pFKI₃₉₈-NS3-3. En esta grafica se encuentran el logaritmo en base 10 vs el CT. Cada uno de los valores representan el promedio de tres replicas. El método presentó un valor de R² = 0.986.

6.6 Evaluación del tratamiento con AINES (AAS y DCF) como monoterapia o terapia combinada (AINES + INF-PEGα + RBV) en la carga viral de pacientes con hepatitis C.

Se evaluó si el efecto antiviral *in vitro* presentado por la aspirina (Trujillo-Murillo y cols¹) y diclofenaco (resultados mostrados anteriormente), también se presentaba *in vivo*. Con base a lo anterior y debido a que estos medicamentos son utilizados a nivel mundial y están aprobados por la FDA (Food and Drug Administration); se investigó el efecto que presentaban los AINES (aspirina y diclofenaco) como monoterapia o terapia combinada (AINES + INF-PEGα + RBV) en la carga viral de los pacientes con hepatitis C.

Para esto se realizó un estudio clínico exploratorio con una duración de dos meses en donde el tratamiento se dividió en 4 fases (Fig 19):

Este esquema de tratamiento nos permitió que el paciente fuera su propio control debido a la presencia de una fase basal. Así como también permitió evaluar el efecto antiviral de los AINES como monoterapia (fase monoterapia) y si estos al combinarse con la terapia estándar (PEFINF- α) presentaban un efecto sinérgico. A continuación se muestran las variables clínicas y demográficas de los pacientes que ingresaron al protocolo clínico.

VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS PACIENTES					
	AAS-1	DCF-1	DCF-2	INF-1	INF-2
	MONOTERAPIA:	MONOTERAPIA	MONOTERAPIA		
	TERAPIA COMBINADA	TERAPIA COMBINADA:	TERAPIA COMBINADA:	TERAPIA	TERAPIA

Figura 35. Variables demográficas y clínicas de los pacientes que ingresaron al protocolo clínico exploratorio: En colores se muestran los diferentes grupos: En rojo se muestra la paciente que recibió como tratamiento aspirina más la terapia estándar (AAS-1); en amarillo se muestran los pacientes que recibieron como tratamiento diclofenaco más la terapia estándar (DCF-1 y DCF-2) y en azul se muestran los pacientes que recibieron únicamente como tratamiento la terapia estándar (INF-1 e INF-2). IMC = índice de masa corporal, AAS = ácido acetilsalísílico, DCF= diclofenaco, PEG-INF= interferón- α , RBV = ribavirina.

La paciente AAS-1 recibió como monoterapia una dosis diaria de 2000 mg (la dosis diaria máxima para un adulto es de 4000 mg) de Ecotrin (aspirina con capa entérica) y durante la terapia combinada recibió: aspirina a una dosis diaria de 2000 mg, PEG-INF α a una dosis de 80 μ g por semana y ribavirina (RBV) a una dosis de 800 mg por día. Las pacientes DCF-1 y DCF-2 recibieron como monoterapia una dosis diaria de 150 mg (la dosis diaria máxima para un adulto es de 200 mg) de Voltaren (diclofenaco) y durante la terapia combinada recibieron: diclofenaco a una dosis diaria de 150 mg, PEG-INF α a una dosis de 120 μ g por semana para el paciente DCF-1, y una dosis de 80 μ g por semana para el paciente DCF-2 y ribavirina (RBV) una dosis de 800 mg por día para ambos pacientes. Los pacientes del grupo control INF-1 e INF-2 recibieron como terapia estándar una dosis semanal de INF-PEG α a una concentración de 120 μ g y 150 μ g, respectivamente y ribavirina a una dosis diaria de 1000 mg para el paciente INF-1 y de 1200 mg para el paciente INF-2.

Las dosis del INF-PEG α y la ribavirina se determinaron en base al peso del paciente y cabe mencionar que los medicamentos fueron prescritos por la Hepatóloga Dra Linda Muñoz Espinoza, Jefa del departamento de Unidad de Hígado del Hospital Universitario de la UANL. Se cuantificó la carga viral en plasma obtenido en los pacientes del protocolo clínico exploratorio, para evaluar la efectividad de cada uno de los esquemas de tratamiento. Se realizó la toma de muestra durante los días mencionados anteriormente (Fig 19 o 20), se hizo la extracción de RNA viral el cual fue sujeto a RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

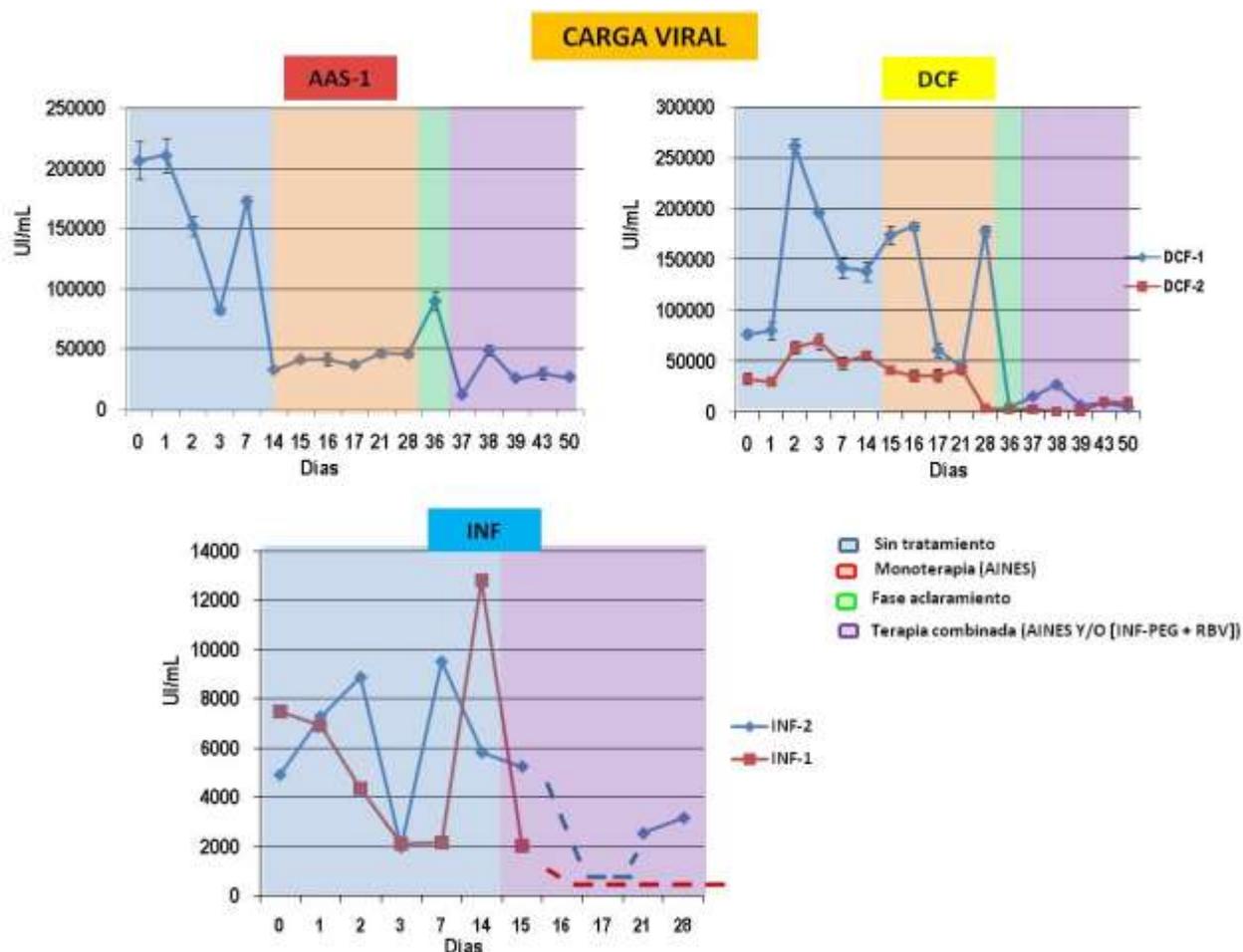


Figura 36 Carga viral en los pacientes con hepatitis C crónica que ingresaron al protocolo clínico: Representación gráfica de la carga viral en UI/mL durante las distintas fases del esquema de tratamiento, las cuales se muestran en distintos colores: fase basal o sin tratamiento en azul; monoterapia con AINES (rosa); fase de aclaramiento (verde); y fase de terapia combinada (morado). Cada una de las graficas representa los pacientes en los distintos grupos de tratamiento. Las líneas punteadas representan valores por debajo del rango de detección (valores < 1000 copias/ml). Cada uno de los puntos representa el promedio de tres replicas.

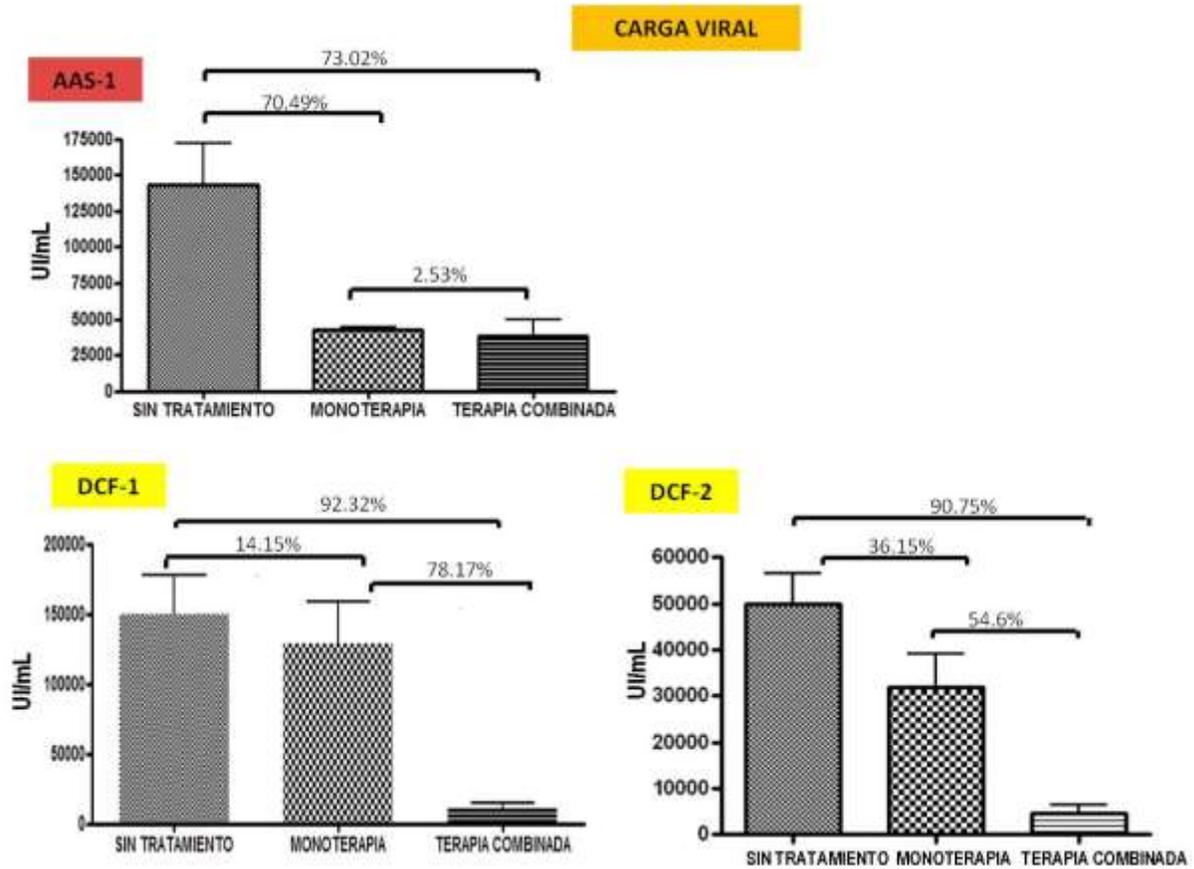


Figura 37. Promedio de la carga viral de los pacientes del protocolo clínico en las distintas fases del tratamiento: Representación gráfica del promedio \pm DS de la carga viral en UI/mL durante las distintas fases del esquema de tratamiento. Los porcentajes (%) representan la disminución de la carga viral para cada uno de los pacientes en las distintas fases de tratamiento.

El tratamiento con aspirina (monoterapia) en la paciente AAS-1 mostró un efecto antiviral al disminuir la carga viral en un 70.49% ($P=0.012^*$) comparado con la fase sin tratamiento; durante la terapia combinada disminuyó en un 73.02% ($P=0.003^*$) al compararla con la fase sin tratamiento. En esta paciente la aspirina no presentó un efecto sinérgico durante la terapia combinada ya que solo disminuyó la carga viral un 2.53% comparado con la fase de monoterapia (Fig 37).

El tratamiento con diclofenaco (monoterapia) en la paciente DCF-1 disminuyó la carga viral en un 14.15% ($P=0.63$) comparado con la fase sin tratamiento; durante la terapia combinada la carga viral disminuyó en un 92.32% ($P=0.002^*$) al compararla con la fase sin tratamiento. En esta paciente el diclofenaco presentó un efecto sinérgico durante la terapia combinada disminuyó la carga viral en un 78.17% ($P=0.008^*$) al compararla con la fase de monoterapia. Este efecto también se observó en la paciente DCF-2 ya que el diclofenaco también disminuyó la carga viral de la paciente en un 36.15% ($P=0.095$) comparado con la fase sin tratamiento; durante la terapia combinada la carga viral disminuyó en un 90.75% ($P=0.000^*$), al igual que en la paciente DCF-1, en la paciente DCF-2 también el diclofenaco presentó un efecto sinérgico al disminuir la carga viral en un 54.6% ($P=0.007^*$) comparado con la fase de monoterapia (Fig. 37).

6.7 Determinación de los marcadores de estrés oxidativo (SOD, Gpx y TBARS) en los pacientes

Existen reportes que pacientes con hepatitis C crónica hay un aumento en los niveles de estrés oxidativo comparado con sujetos sanos; y que esta condición le confiere una ventaja replicativa al virus⁵⁹. Se propone que la aspirina posee una propiedad antioxidante y es a través de este mecanismo que posee un efecto antiviral. Con base a lo anterior se evaluó el papel de los marcadores de estrés oxidativo (SOD, Gpx y TBARS) y la relación con la respuesta a la terapia. A partir de suero se cuantificaron los niveles de la enzima SOD por medio de espectrofotometría durante las distintas fases de tratamiento (Fig. 38).

Los resultados muestran que la aspirina presentó un efecto antioxidante en la paciente AAS-1 al aumentar la actividad de la enzima SOD al comparar la media de la monoterapia con la fase sin tratamiento y la actividad de la enzima se vió ligeramente aumentada durante la fase de terapia combinada vs la fase sin tratamiento (Fig. 38). En la paciente DCF-1 la actividad de la enzima SOD aumento durante los últimos días de la fase de monoterapia y este incremento continuo durante la terapia combinada (Fig. 38). En la paciente DCF-2 los niveles de la enzima SOD permanecen constantes durante las distintas fases de tratamiento. En los pacientes INF-1 e INF-2 se observó el mismo efecto en donde la actividad de SOD aumento con la fase sin tratamiento.

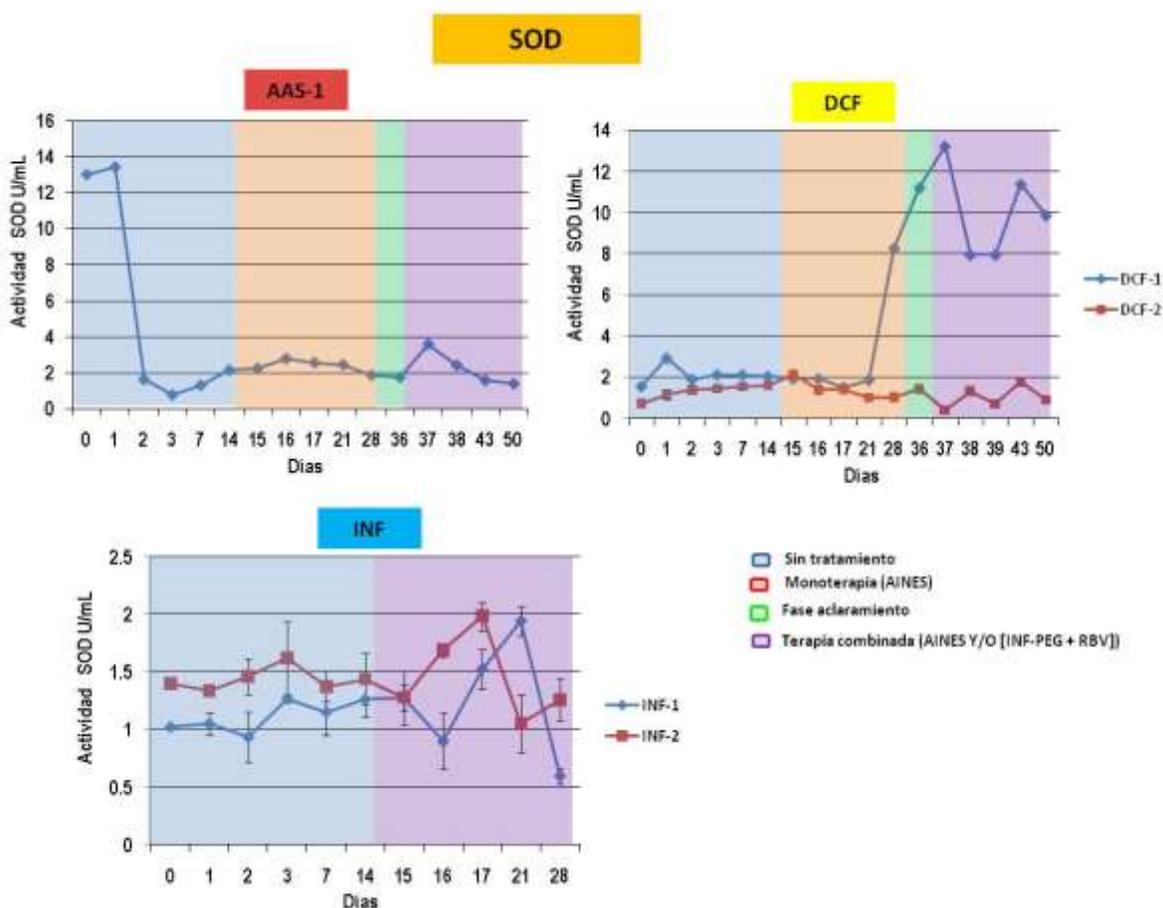


Figura 38. Actividad de la enzima SOD en los pacientes: Representación gráfica del promedio \pm DS en UI/mL durante las distintas fases del esquema de tratamiento. La actividad de la enzima fue determinada por espectrofotometría utilizando el kit de la marca Cayman. Durante las distintas fases del esquema de tratamiento, las cuales se muestran en distintos colores: fase basal o sin tratamiento en azul, monoterapia con AINES (rosa), fase de aclaramiento (verde) y fase de terapia combinada (morado). Cada una de las graficas representa los pacientes en los distintos grupos de tratamiento.

La actividad de la enzima Gpx se cuantificó a partir de plasma por medio de espectrofotometría, durante las distintas fases de tratamiento (Fig. 39).

Los resultados muestran que la aspirina disminuyó la actividad de la enzima Gpx en la paciente AAS-1 al comparar la media de la monoterapia con la fase sin tratamiento y la actividad de la enzima se vio aumentada durante la fase de terapia combinada vs la fase sin tratamiento (Fig. 39). En la paciente DCF-1 la actividad de la enzima Gpx aumentó durante los la fase de monoterapia y este incremento continuo durante la terapia combinada (Fig. 39). En la paciente DCF-2 los niveles de la enzima Gpx disminuyeron ligeramente durante la fase de monoterapia vs sin tratamiento y hubo un aumento en la actividad de la enzima durante la terapia combinada vs la fase sin tratamiento. En los pacientes INF-1 e INF-2 se observó el mismo efecto en donde la actividad de Gpx aumentó con la fase sin tratamiento.

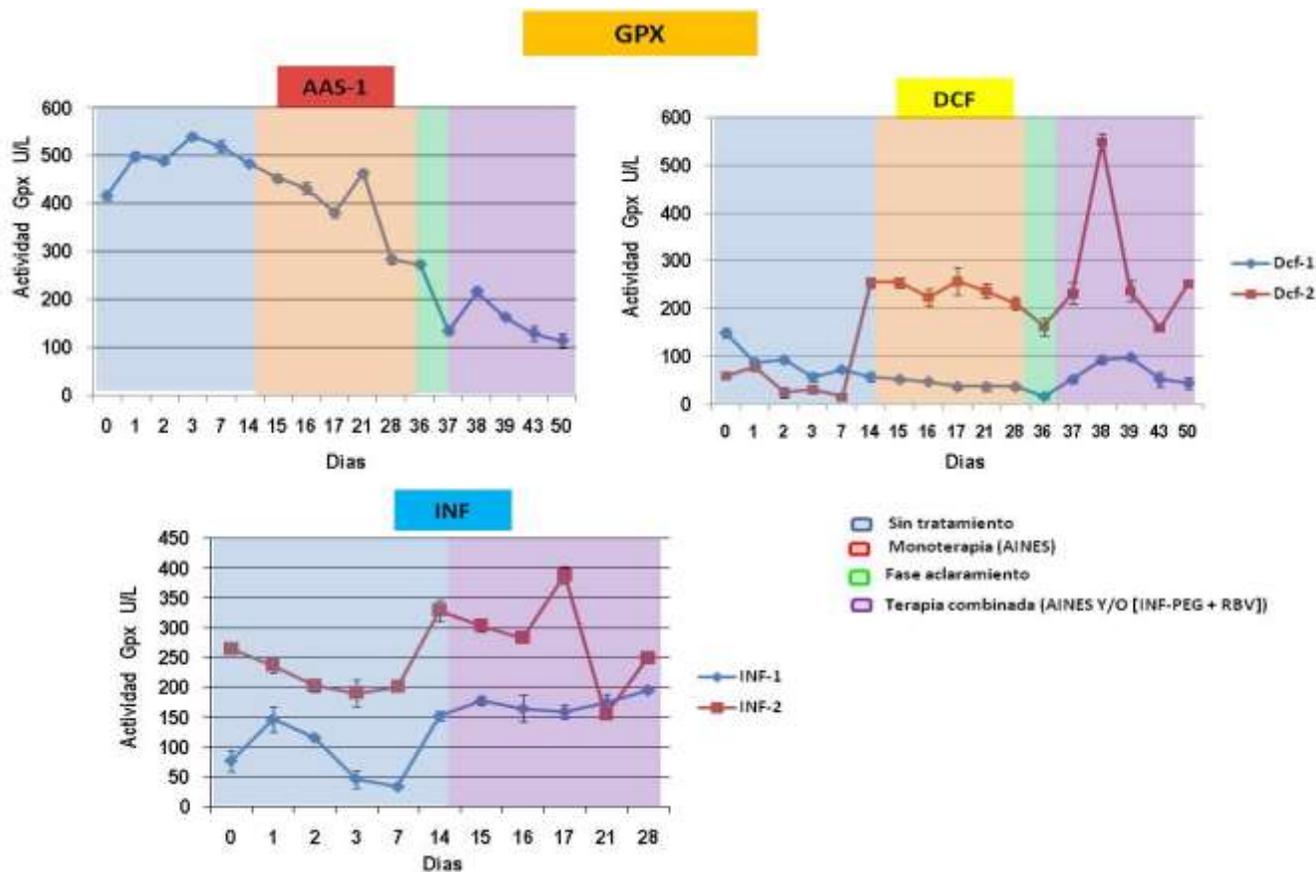


Figura 39. Actividad de la enzima Gpx en los pacientes: Representación gráfica del promedio \pm DS en UI/mL durante las distintas fases del esquema de tratamiento. La actividad de la enzima fue determinada por espectrofotometría utilizando el kit de la marca OXltek. Durante las distintas fases del esquema de tratamiento, las cuales se muestran en distintos colores: fase basal o sin tratamiento en azul, monoterapia con AINES (rosa), fase de aclaramiento (verde) y fase de terapia combinada (morado). Cada una de las graficas representa los pacientes en los distintos grupos de tratamiento.

El MDA (malondialdehído) es un producto de peroxidación lipídica, el cual reacciona con el TBARS (ácido tiobarbirtúrico) en una relación 1:2 y este se cuantifica a partir de suero por medio de fluorescencia, durante las distintas fases de tratamiento^{59, 60} (Fig. 40).

Los resultados muestran que la aspirina presentó un efecto antioxidante en la paciente AAS-1 al comparar la media de los niveles de TBARS durante la monoterapia con la fase sin tratamiento y los niveles de peroxidación lipídica la disminuyeron aun más durante la fase de terapia combinada vs la fase sin tratamiento (Fig. 40). En la paciente DCF-1 los niveles de peroxidación lipídica disminuyeron durante la fase de monoterapia y esta disminución continua durante la terapia combinada (Fig. 40). En la paciente DCF-2 los niveles de TBARS se mantienen constantes durante las distintas fases del tratamiento. En los pacientes INF-1 e INF-2 se observó el mismo efecto en donde los niveles de TBARS disminuyeron con la fase sin tratamiento.

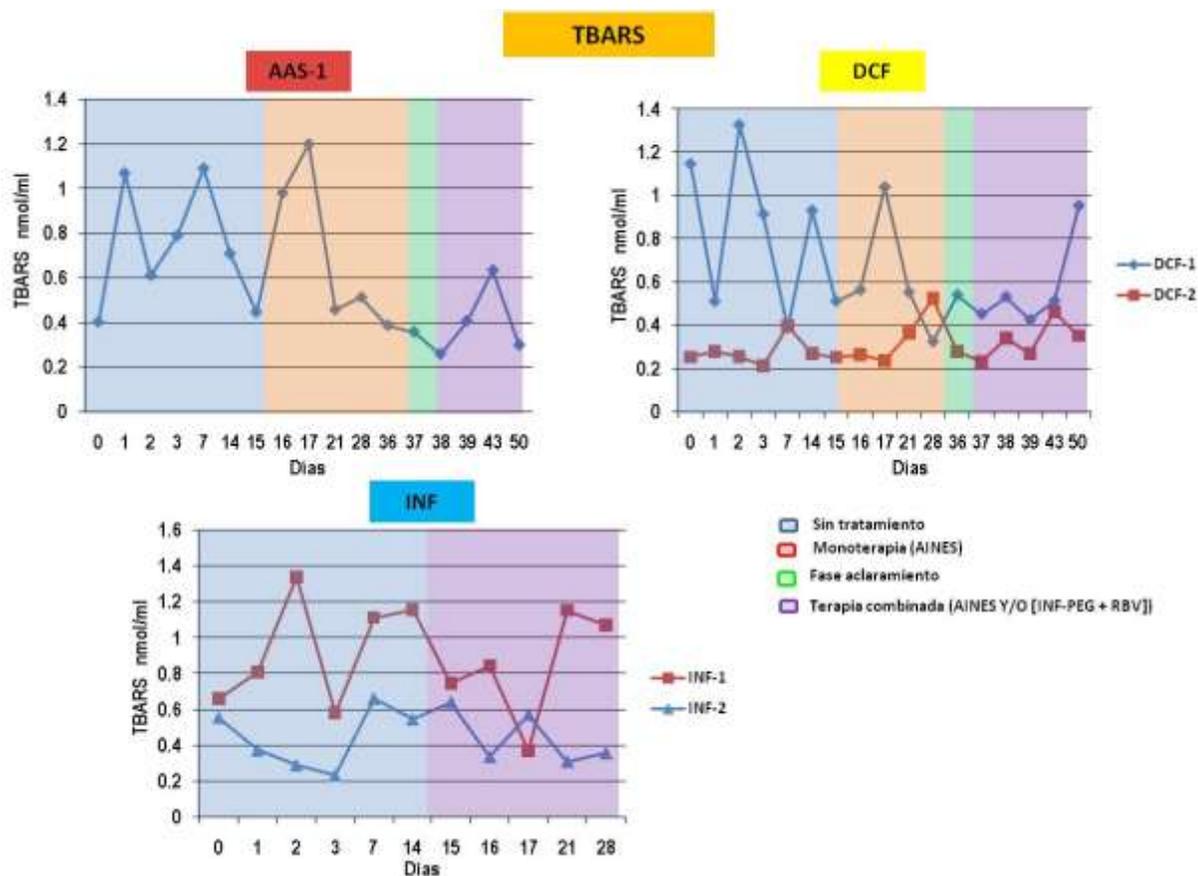


Figura 40. Niveles de peroxidación lipídica (TBARS) en los pacientes del protocolo clínico exploratorio: Representación gráfica del promedio \pm DS en nmol/mL durante las distintas fases del esquema de tratamiento. La actividad de la enzima fue determinada por fluorescencia utilizando el kit de la marca OXltek. Durante las distintas fases del esquema de tratamiento, las cuales se muestran en distintos colores: fase basal o sin tratamiento en azul, monoterapia con AINES (rosa), fase de aclaramiento (verde) y fase de terapia combinada (morado). Cada una de las graficas representa los pacientes en los distintos grupos de tratamiento.

6.8 Evaluación de los efectos adversos al tratamiento en los pacientes

Para evaluar los efectos adversos que se presentaron durante el tratamiento se realizó un cuestionario en donde los síntomas se agruparon en: gripales, gastrointestinales, dermatológicos, neurológicos, hematológicos e inmunológicos (Fig. 21). Síntomas propios de la terapia con Peg-Interferón alfa y ribavirina.

Los pacientes AAS-1, INF-1 e INF-2 mostraron los síntomas que comúnmente se presentan con la terapia estándar con INF-PEGα y RBV. En los pacientes DCF-1 y DCF-2 el diclofenaco aminoro los síntomas causados por la terapia estándar, dato que no esta reportado en la literatura.

EFFECTOS ADVERSOS

	AAS-1	DCF-1	DCF-2	INF-1	INF-2
MONOTERAPIA	Dolor de Espalda Dif para concentrarse Pérdida de peso ALT y AST ↑	No presentó síntomas ALT y AST ↓	Acidez ALT y AST ↑	-----	-----
TERAPIA COMBINADA	Leucopenia Trombocitopenia Fiebre Escalofrios Dolor de Espalda Nausea Dolor de Abdomen ALT y AST ↑	Leucopenia Trombocitopenia Cefalea leve Astenia Fiebre Escalofrios ALT y AST ↓	Acidez Leucopenia ALT y AST ↑	Leucopenia Astenia Mialgias Fiebre Cefalea Dolor de Espalda Escalofrios ALT y AST ↑	Leucopenia Trombocitopenia Astenia Diarrea Fiebre Alopecia Prurito Artralgias Ansiedad Dolor de Espalda Nausea ALT y AST ↓

Figura 41. Evaluación de los efectos adversos en los pacientes: Los resultados mostrados son un resumen de los efectos adversos que se obtuvieron a partir de un cuestionario basado en los efectos secundarios propios de la terapia con Peg-Interferon alfa y ribavirina. Los niveles de transaminasas (ALT y AST) se determinaron por medio de química seca utilizando el sistema VITROS DTII60. El conteo de células sanguíneas se determinó mediante el CELLDYN.

VII. DISCUSIÓN

La hepatitis C constituye un problema importante de salud debido al gran número de personas infectadas alrededor del mundo (~170 millones de individuos), además la hepatitis C crónica es la principal causa de daño hepático y puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC)³². Actualmente la única terapia disponible para este tipo de pacientes es el Interferon- α pegilado en combinación con ribavirina⁵⁰. Sin embargo, del 16-24% de los pacientes con genotipos 2 y 3, y del 48-58% de los pacientes con genotipo 1 no responden a la terapia⁶¹. Existen múltiples factores que predisponen a que un paciente no responda al tratamiento dentro de los cuales se encuentran: pacientes con obesidad, edad avanzada, sexo masculino, genotipo 1 del virus, alta carga viral, afroamericanos, co-infección con VIH, problemas renales, ingesta de alcohol, pacientes con un estado de fibrosis o cirrosis avanzada; todos estos factores están relacionados a fallar a la terapia, sin embargo existen mecanismos que aun no están esclarecidos^{30, 33, 54}. Debido al gran número de pacientes no respondedores, al elevado costo de la terapia y a severos efectos adversos y contraindicaciones de la terapia estándar; surge la necesidad de desarrollar nuevas terapias alternativas más eficientes, seguras, económicas y tolerables para los pacientes con hepatitis C crónica⁵⁰.

Existen reportes de que el ácido acetilsalicílico (AAS) disminuye la replicación y expresión génica del VHC en el modelo de replicones subgenómicos; efecto que parece ser modulado por la enzima COX-2¹. El AAS pertenece a un grupo de fármacos denominados antiinflamatorios no esteroideos (AINES) ampliamente utilizados a nivel mundial y comúnmente administrados por prescripción o automedicación⁶². El mecanismo de los AINES consiste en bloquear la actividad de las enzimas COX (COX-1 y COX-2), afectando la producción de prostaglandinas E₂ (PGE₂)⁵². Se sabe que la expresión de COX-2 y PGE₂ se encuentra aumentada en células que expresan el virus de la hepatitis C^{55, 63}. Sin embargo se desconoce si el efecto antiviral de la aspirina es una característica química propia o es compartida por otros AINES.

Para tal propósito se utilizó el modelo de replicones subgenómicos del VHC. Este sistema solo expresa las proteínas no estructurales del virus, las cuales participan en la replicación del VHC^{64, 65}. Este modelo representa una alternativa importante para el estudio de nuevos tratamientos para la hepatitis C.

Los resultados de este trabajo demuestran que el tratamiento con diclofenaco (en un rango de concentraciones de 50-150 μM) disminuyó los niveles del RNA viral a las 24 y 48 h pos-tratamiento hasta en un 45% (para la concentración de 50 μM tiempo 24 h) (Fig. 22). Mientras que los niveles de la proteína NPT-II (forma parte del replicón de VHC) fueron similares a los observados en las células sin tratamiento cuando se utilizaron las concentraciones de 50 y 100 μM (Fig. 28). La regulación negativa del VHC inducida por diclofenaco fue revertido debido a que se observó un aumento en los niveles del RNA del VHC (hasta 1.91 veces) y de la proteína NPT-II (hasta 1.82 veces con la concentración de 150 μM) comparado con las células sin tratamiento. El tratamiento con salicilato de sodio (en un rango de concentraciones de 2-6 mM) reguló de manera negativa la expresión del replicón subgenómico del VHC (Fig. 23), debido a que disminuyó los niveles del RNA viral; siendo este efecto más evidente para la concentración de 2mM a las 24 h (59%); así como también disminuyó los niveles de la proteína NPT-II hasta en un 36% (Fig.29). En el caso del tratamiento con Indometacina (a las concentraciones de 50-150 μM) a las 24 horas pos-tratamiento, se disminuyeron los niveles del RNA viral hasta en un 64% (Fig.24) y la proteína NPT-II hasta en un 28% (Fig. 30). La regulación negativa inducida por indometacina se ve revertida a partir de las 48 horas pos-tratamiento ya que el tratamiento aumentó los niveles del RNA viral hasta 1.92 veces y la proteína NPT-II hasta 2.2 veces para la concentración de 150 μM a las 72 h. Las concentraciones utilizadas para este estudio para los tres AINES (diclofenaco, salicilato de sodio e indometacina) no fueran tóxicas para las células, debido a que presentaron una viabilidad celular de hasta un 90% a las 72 horas pos-tratamiento (Fig. 25-27).

Se ha propuesto que la enzima COX-2 participa en la regulación de la replicación del VHC y que posiblemente a través de la inhibición de su actividad enzimática que la aspirina regula de manera negativa la replicación y expresión génica del VHC. Para evaluar la participación de COX-2, se analizó la enzima a dos niveles: 1) expresión de COX-2 por medio de ensayos de western blot y 2) actividad enzimática de COX-2 cuantificando la producción de prostaglandinas.

Debido a que con las concentraciones de 50 y 100 μM de diclofenaco los niveles de la proteína COX-2 fueron ligeramente aumentados comparado con las células sin tratamiento. Sin embargo, la concentración de 150 μM de diclofenaco disminuyó los niveles de COX-2 hasta en un 40% (Fig. 28).

Estos resultados sugieren que el efecto de regulación negativa inducido por el diclofenaco parece ser un mecanismo independiente de la enzima COX-2.

En el caso de salicilato de sodio observamos un efecto inhibitor de la actividad de COX-2 a partir de las 48 h y 72 h pos-tratamiento (Fig. 32); así como también una disminución en los niveles de la enzima COX-2 (Fig. 29), efectos que parecen estar asociados con la regulación negativa del RNA de VHC inducida por salicilato.

Para el tratamiento con indometacina se observó un aumento en los niveles de COX-2 para las concentraciones de 100 y 150 μM a partir de las 48 h pos-tratamiento (Fig. 30); así como, una disminución para las tres concentraciones a las 24 h. Sugiriendo que este efecto puede estar relacionado con el efecto negativo de la indometacina en los niveles del RNA viral observado a las 24 h pos-tratamiento para las concentraciones 50-150 μM . Por lo tanto la regulación negativa del VHC inducido por indometacina parece estar modulada por la disminución en los niveles de la COX-2.

La inhibición en la producción de las PGE_2 se produjo a partir de las 48 h para los tres AINES evaluados en este estudio; esta inhibición no fue concentración o tiempo dependiente efecto que se observó durante el tratamiento con aspirina por Trujillo-Murillo y cols¹. Este efecto probablemente se debe a los diferentes mecanismos en que los AINES inhiben la actividad enzimática de COX-2. La aspirina es el único inhibidor irreversible de la enzima COX, mientras que el resto de los AINES inhiben a la enzima de manera reversible y competitiva⁶⁶. Hwang y cols.⁶⁷ reportaron que en células C6 de glioma la aspirina a 2-8 μM inhibió la producción de PGE_2 por más de 24 horas pos-tratamiento; en cambio la indometacina a 2-4 μM inhibió la producción de PGE_2 ; sin embargo este efecto que no se observó por más de 12 horas pos-tratamiento. Los resultados obtenidos en la cuantificación de PGE_2 demuestran que el diclofenaco, el salicilato de sodio y la indometacina están llevando a cabo su acción farmacológica.

En resumen al comparar el efecto antiviral de cada uno de los AINES evaluados, el fármaco que presentó un efecto antiviral hasta las 72 h pos-tratamiento similar al de la aspirina fue el salicilato de sodio fármaco que pertenece a la misma familia química de la aspirina⁶⁶.

Con base a los resultados obtenidos previamente y a que los AINES son fármacos ampliamente utilizados a nivel mundial⁵⁴.

Se realizó un estudio clínico exploratorio para evaluar el efecto de la aspirina y diclofenaco en la carga viral de pacientes con hepatitis C crónica. Para ello se cuantificó la carga viral durante las distintas fases del esquema de tratamiento: fase basal (sin tratamiento), fase de monoterapia con AINES (aspirina o diclofenaco), fase de aclaramiento (sin tratamiento para eliminar el AINES de la circulación sanguínea) y la fase de terapia combinada (AINES [aspirina o diclofenaco] más INF-PEG α y ribavirina).

Es importante mencionar que el diseño del estudio permitió que el paciente fuera su propio control debido a que se cuenta con una fase sin tratamiento o basal; la fase de monoterapia permitió evaluar si los AINES presentaban un efecto antiviral *per se*; la fase de terapia combinada permitió evaluar si los AINES al combinarse con la terapia estándar presentaban un efecto sinérgico.

En la paciente AAS-1 la aspirina disminuyó la carga viral en un 70.49% (Fig 37) durante la fase de monoterapia (comparado con la fase basal) y en un 73.02% durante la fase de terapia combinada (comparado con la fase basal). Es interesante mencionar que esta paciente respondió de manera satisfactoria al tratamiento a pesar de que había sido catalogada como paciente no respondedora, debido a que anteriormente había recibido tres esquemas de tratamiento completos con la terapia estándar (interferón- α pegilado y ribavirina), además era una paciente cirrótica, de edad avanzada (60 años) y genotipo 1a factores que predisponen a no responder a la terapia. Por lo tanto, en esta paciente la aspirina presentó un efecto antiviral concordando con lo observado *in vitro* por Trujillo-Murillo y cols¹.

En los pacientes DCF-1 y DCF-2 el tratamiento con diclofenaco disminuyó la carga viral en un 14.15% y 36.15%, respectivamente (comparado con la fase basal). Interesantemente, en ambos pacientes se observó que el diclofenaco presentó un efecto sinérgico al ser combinado con la terapia estándar (INF-PEG α y RBV) al disminuir la carga viral en un 92.32% y 90.75%, respectivamente (comparado con la fase basal). Los pacientes respondieron de manera satisfactoria al tratamiento a pesar de que la paciente DCF-1 era una paciente con altas probabilidades de no responder a la terapia; debido a que era una paciente cirrótica, de edad avanzada (51 años) y genotipo 1a.

Existen reportes de que algunos AINES como Indometacina, Tenoxicam y Ketoprofeno incrementan la eficiencia del tratamiento con interferón- α ^{68, 69, 70}, se propone que la vía por la cual los AINES potencian la respuesta a interferón, se debe a que al bloquear la vía del

ácido araquidónico (vía en la que participa la enzima COX-2) activan la fosforilación de STAT-1 factor de transcripción que estimula la activación de la vía de interferón- α ^{70, 71}. Sin embargo hasta la fecha no existen reportes en la literatura de que el diclofenaco presenta un efecto antiviral como monoterapia; así como un sinergismo en combinación con la terapia estándar en pacientes con VHC.

Los pacientes INF-1 e INF-2, los cuales recibieron como tratamiento únicamente la terapia estándar la carga viral disminuyó hasta valores indetectables en plasma con base a nuestro método (<1000 copias/ml). Es importante mencionar que ambos pacientes presentaban una carga viral baja y en el caso de la paciente INF-1 un genotipo 2b factores que predisponen a una respuesta favorable al tratamiento.

Para la determinación de la carga viral en pacientes VHC, se desarrolló e implementó un método de cuantificación por PCR en tiempo real por medio de sondas TaqMan. El rango dinámico de nuestro método fue de 10^3 - 20^7 , con un coeficiente de regresión de la curva estándar de 0.98 (Fig. 34). El coeficiente de variación intra-ensayo e interensayo en el CT fue de 0.29% y 4.41%, respectivamente. Este método mostró ser sensible, reproducible y rápido para cuantificar un número de muestras; así como útil para monitorear la carga viral durante los distintos esquemas de tratamiento evaluados en este estudio. La sensibilidad de del método fue de 1000 copias/ml concuerda con lo reportado⁵⁸.

Existen varios reportes de que el VHC induce un aumento en el estrés oxidativo al aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno como el radical súperoxido y el peróxido de hidrógeno⁷² y disminuir la actividad de las enzimas SOD y Gpx⁵⁹; y se propone que es a través de la inhibición de COX-2 (mediador de la vía de estrés oxidativo) que la aspirina posee un efecto antiviral contra VHC. Con base a lo anterior se evaluó el papel que juegan los marcadores de estrés oxidativo (SOD, Gpx y TBARS) en la respuesta a la terapia. Por lo que se evaluaron la actividad de las enzimas SOD, Gpx y TBARS en los pacientes incluidos en el protocolo clínico exploratorio.

La enzima SOD (súperoxido dismutasa) protege a la célula del efecto tóxico del radical súperoxido al catalizar su dismutación en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno^{59, 73}. La actividad de la enzima SOD en la paciente AAS-1 aumentó ligeramente durante la monoterapia con aspirina y este efecto fue más notorio durante la fase de terapia combinada (Fig. 38).

En la paciente DCF-1 la actividad de SOD se incrementó durante la monoterapia con diclofenaco (comparado con la fase sin tratamiento) y este aumento permaneció durante la terapia combinada (Fig. 38).

En la paciente DCF-2 la actividad de la enzima permaneció constante durante las distintas fases del tratamiento.

Los pacientes INF-1 e INF-2 presentaron un comportamiento similar al verse aumentada la actividad de la SOD durante el tratamiento con la terapia estándar (Fig. 38). En la literatura se encuentra reportado que pacientes que responden de manera satisfactoria a la terapia presentan un aumento en la actividad de la enzima SOD⁵⁹.

La enzima Gpx (Glutatión peroxidasa) metaboliza el peróxido de hidrógeno⁷⁴. La paciente AAS-1 presentó una disminución notoria en la actividad de la enzima durante la monoterapia con aspirina (Fig.39), efecto que se vió incrementado durante la terapia combinada. En la paciente DCF-1 se observó un aumento en los niveles de la enzima Gpx tanto durante la monoterapia con diclofenaco como durante la terapia combinada (Fig. 39). En la paciente DCF-2 se observó una ligera disminución en la actividad de la enzima durante la monoterapia y un aumento en la terapia combinada. En los pacientes INF-1 e INF-2 se presentó un comportamiento similar en donde la actividad de Gpx se vio aumentada durante el tratamiento con la terapia estándar en comparación de la fase sin tratamiento. Dentro de la literatura reportaron que la actividad de Gpx aumenta en pacientes con hepatitis C crónica al presentarse una respuesta favorable al tratamiento con la terapia estándar^{59, 75}.

La peroxidación lípidica es un indicativo de daño celular como resultado del estrés oxidativo, uno de estos productos de peroxidación lípidica es el malondialdehido (MDA)⁶⁰. La formación de MDA se ve incrementada en enfermedades de carácter inflamatorio dentro de las cuales se encuentra la hepatitis C⁷⁶. La determinación de los niveles de peroxidación lípidica se realizó a partir de la cuantificación de especies que reaccionan con ácido tiobarbitúrico, que son especies fluorescentes⁶⁰. Los niveles de TBARS disminuyeron durante la terapia con aspirina en la paciente AAS-1 efecto que fue más evidente durante la terapia combinada.

En la paciente DCF-1 durante el tratamiento de monoterapia con diclofenaco aumento ligeramente los niveles de TBARS; sin embargo los niveles de peroxidación lípidica

disminuyeron durante la terapia combinada. En el caso de la paciente DCF-2 los valores de TBARS permanecieron constantes durante las distintas fases de tratamiento. En los pacientes INF-1 e INF-2 se observó en ambos una disminución en los niveles de TBARS (Fig.40). Varios reportes indican que una disminución en los niveles de TBARS esta asociado a una respuesta favorable al tratamiento^{59, 60, 76}.

Las diferencias observadas en la evaluación de los distintos marcadores de estrés oxidativo en las pacientes DCF-1 y DCF-2 probablemente este relacionada a la distinta evolución de la enfermedad, ya que la paciente DCF-1 es una paciente cirrótica de 51 años en cambio la paciente DCF-2 es una paciente de 36 años con fibrosis (aunque no se posee un resultado de la biopsia, la cirrosis es un proceso de evolución crónico degenerativo, que se presenta tras 10-20 de evolución de la enfermedad).

Para evaluar los efectos adversos al tratamiento se realizó un cuestionario, una biometría hemática y determinación de transaminasas, tomando como base los efectos secundarios que se presentan de manera habitual durante el tratamiento con la terapia estándar (PEG-INF α y RBV). Los pacientes AAS-1, INF-1 e INF-2 presentaron síntomas propios al tratamiento estándar. Como un hallazgo sorprendente el diclofenaco aminoro los síntomas producidos por la terapia estándar en los pacientes DCF-1 y DCF-2. Asnis y cols.⁷⁷ reportaron que el diclofenaco disminuye un gran número de efectos secundarios que presenta el interferon dentro de los cuales se encuentran: activación de las citocinas, liberación de las hormonas del estrés y alteraciones neuroquímicas en sujetos tratados con INF- α . Sin embargo no existen reportes para pacientes VHC.

En resumen los pacientes incluidos en el estudio clínico exploratorio que recibieron como tratamiento un AINES tuvieron una respuesta favorable al tratamiento, cabe mencionar que dos pacientes eran cirróticos (AAS-1 y DCF-1), eran genotipo 1, dos de ellas de edad avanzada (AAS-1 y DCF-1), factores que predisponen a una respuesta negativa a la terapia, así como también el tratamiento fue agudo es decir solo tuvo una duración de cuatro semanas a diferencia de los seis meses que dura un tratamiento convencional.

VIII. CONCLUSIONES

- El tratamiento con Diclofenaco (50-150 μ M) disminuyó los niveles del RNA viral a las 24 y 48 h post-tratamiento; sin embargo incrementó el nivel de la proteína NPT-II. El Diclofenaco también disminuyó los niveles de la proteína COX-2.
- El tratamiento con Indometacina (50-150 μ M) disminuyó los niveles del RNA viral a las 24 h post-tratamiento; sin embargo aumento el nivel de la proteína NPT-II. La Indometacina disminuyó los niveles de la proteína COX-2 (50-100 μ M).
- El tratamiento con Salicilato de Sodio (2-6 mM) disminuyó los niveles del RNA y proteínas virales a las 24-72 h post-tratamiento. El Salicilato también disminuyó los niveles de la proteína COX-2.
- La administración de aspirina en sujetos infectados con el VHC disminuyó la carga viral en plasma.
- La Aspirina mostró un efecto antioxidante al aumentar los niveles de la enzima SOD y disminuir la peroxidación lípidica.
- El Diclofenaco disminuyó los niveles del RNA-VHC (carga viral) en plasma, este efecto también se observó *in vitro*. Así como mostró un efecto sinérgico al combinarse con la terapia estándar.

IX. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de expresión génica para dilucidar la vía por la cual la Aspirina y el Salicilato de Sodio disminuyen la carga viral en plasma de sujetos infectados.
- Evaluar si otros AINES poseen un modifican los niveles de oxidantes o si es solo característico de la Aspirina.
- Aumentar el número de pacientes en el estudio clínico exploratorio.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Trujillo-Murillo K, Rincon-Sanchez AR, Martinez-Rodriguez H, et al. Acetylsalicylic acid inhibits hepatitis C virus RNA and protein expression through cyclooxygenase 2 signaling pathways. *Hepatology* 2008;47:1462-72.
2. Bryan-Marrugo. Participación del estrés oxidativo en la regulación negativa del VHC inducida por ácido acetilsalicílico. Tesis de Maestría Facultad de Medicina UANL 2007.
3. Kronenberger B, Welsch C, Forestier N, Zeuzem S. Novel hepatitis C drugs in current trials. *Clin Liver Dis* 2008;12:529-55, viii.
4. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985;317:489-95.
5. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13:2436-41.
6. Mendez-Sanchez N, Motola-Kuba D, Zamora-Valdes D, et al. Risk factors and prevalence of hepatitis virus B and C serum markers among nurses at a tertiary-care hospital in Mexico City, Mexico: a descriptive study. *Ann Hepatol* 2006;5:276-80.
7. Nahum Méndez-Sánchez MD, Ph. D., Héctor Baptista-González, M. D., Raúl Hiram Sánchez-Gómez, M. D., Javier Bordes-Aznar, M. D., Misael Uribe-Esquivel, M. D. Prevalencia de hepatitis B y C en donadores de sangre en un hospital de tercer nivel de la ciudad de México. *Salud pública de México* 1999;41:475-8.
8. Sanchez-Avila JF, Gonzalez E, Vazquez V, Suarez S, Uribe M. Geographical distribution of HCV genotypes in Mexico. *Ann Hepatol* 2007;6:156-60.
9. Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, et al. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:24-32.
10. Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005;436:933-8.
11. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 2004;85:3173-88.
12. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:223-35.
13. National Consensus of Hepatitis C. June 28-29, 2002. *Ann Hepatol* 2002;1:148-54.
14. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345:41-52.
15. Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006;3:47-52.
16. McCaughan GW, George J. Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection. *Gut* 2004;53:318-21.
17. Teixeira R, Marcos LA, Friedman SL. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis: New insights into antifibrotic therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2007;37:579-95.
18. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209-18.
19. Benvegnu L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004;53:744-9.
20. Anand BS. Cirrhosis of liver. *West J Med* 1999;171:110-5.
21. Michielsen PP, Francque SM, van Dongen JL. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol* 2005;3:27.
22. Raoul JL. Natural history of hepatocellular carcinoma and current treatment options. *Semin Nucl Med* 2008;38:S13-8.
23. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13:2461-6.

24. Richter SS. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:4407-12.
25. Musana KA, Yale SH, Abdulkarim AS. Tests of liver injury. *Clin Med Res* 2004;2:129-31.
26. Giboney PT. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am Fam Physician* 2005;71:1105-10.
27. Scheuer PJ. Liver biopsy size matters in chronic hepatitis: bigger is better. *Hepatology* 2003;38:1356-8.
28. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-93.
29. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-9.
30. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci* 2006;3:35-40.
31. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Practical use of hepatitis C virus kinetics monitoring in the treatment of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2007;14 Suppl 1:77-81.
32. Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2006;355:2444-51.
33. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005;436:967-72.
34. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Interferon-based therapy of hepatitis C. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1222-41.
35. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998;282:103-7.
36. Pawlotsky JM, Dahari H, Neumann AU, et al. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2004;126:703-14.
37. Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA, et al. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug Chem* 2001;12:195-202.
38. Grace M, Youngster S, Gitlin G, et al. Structural and biologic characterization of pegylated recombinant IFN-alpha2b. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:1103-15.
39. Wang YS, Youngster S, Bausch J, Zhang R, McNemar C, Wyss DF. Identification of the major positional isomer of pegylated interferon alpha-2b. *Biochemistry* 2000;39:10634-40.
40. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-65.
41. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-82.
42. Ferenci P. Peginterferon alfa-2a (40KD) (Pegasys) for the treatment of patients with chronic hepatitis C. *Int J Clin Pract* 2003;57:610-5.
43. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S145-51.
44. Poynard T, McHutchison J, Manns M, et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1303-13.
45. Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, et al. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;33:433-8.

46. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-55.
47. Zdilar D, Franco-Bronson K, Buchler N, Locala JA, Younossi ZM. Hepatitis C, interferon alfa, and depression. *Hepatology* 2000;31:1207-11.
48. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998;339:1485-92.
49. Carreno V, Martin J, Pardo M, et al. Randomized controlled trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for the treatment of chronic hepatitis c. *Cytokine* 2000;12:165-70.
50. Deusch M, Hadziyannis SJ. Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update. *J Viral Hepat* 2008;15:2-11.
51. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV. Emerging treatments in chronic hepatitis B. *Expert Opin Emerg Drugs* 2004;9:207-21.
52. Jurgen S. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res* 2000;2:379-85.
53. JR V. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 1970;231:232-5.
54. Copeland RA WJ, Giannaras J, Numberg S, Covington M, Pinto D, Pick S, Trzaskos JM. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11202-6.
55. 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.
56. Waris G, Tardif KD, Siddiqui A. Endoplasmic reticulum (ER) stress: hepatitis C virus induces an ER-nucleus signal transduction pathway and activates NF-kappaB and STAT-3. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1425-30.
57. Tardif KD, Waris G, Siddiqui A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. *Trends Microbiol* 2005;13:159-63.
58. Martell M, Gomez J, Esteban JI, et al. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 1999;37:327-32.
59. Levent G, Ali A, Ahmet A, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J Transl Med* 2006;4:25.
60. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 5:1229-34.
61. Pawlotsky JM. Treating hepatitis C in "difficult-to-treat" patients. *N Engl J Med* 2004;351:422-3.
62. Sanderson S, Emery J, Baglin T, Kinmonth AL. Narrative review: aspirin resistance and its clinical implications. *Ann Intern Med* 2005;142:370-80.
63. Manning DS, Sheehan KM, Byrne MF, Kay EW, Murray FE. Cyclooxygenase-2 expression in chronic hepatitis C and the effect of interferon alpha treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1633-7.
64. 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.
65. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro models. *J Viral Hepat* 2007;14 Suppl 1:64-7.

66. M. R. Moreno-Brea JAM. Inhibidores de la COX-2: Mecanismos de acción. IV Reunion científica de la sociedad española del dolor 1990:3-8.
67. Hwang SL, Lee KS, Lin CL, et al. Effect of aspirin and indomethacin on prostaglandin E2 synthesis in C6 glioma cells. *Kaohsiung J Med Sci* 2004;20:1-5.
68. Andreone P, Cursaro C, Gramenzi A, et al. Interferon alpha plus ketoprofen or interferon alpha plus ribavirin in chronic hepatitis C non-responder to interferon alpha alone: results of a pilot study. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:688-94.
69. Zarski JP, Maynard-Muet M, Chousterman S, et al. Tenoxicam, a non-steroid anti-inflammatory drug, is unable to increase the response rate in patients with chronic hepatitis C treated by alpha interferon. *Hepatology* 1998;27:862-7.
70. Andreone P, Cursaro C, Gramenzi A, et al. Indomethacin enhances serum 2'5'-oligoadenylate synthetase in patients with hepatitis B and C virus chronic active hepatitis. *J Hepatol* 1994;21:984-8.
71. Giambartolomei S, Artini M, Almerighi C, Moavero SM, Levrero M, Balsano C. Nonsteroidal anti-inflammatory drug metabolism potentiates interferon alfa signaling by increasing STAT1 phosphorylation. *Hepatology* 1999;30:510-6.
72. Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM, Lai MM. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 2006;80:7199-207.
73. Larrea E, Beloqui O, Munoz-Navas MA, Civeira MP, Prieto J. Superoxide dismutase in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1235-41.
74. Chrobot AM, Szaflarska-Szczepanik A, Drewa G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. *Med Sci Monit* 2000;6:713-8.
75. Lim HL, Myers BM, Hamilton BA, Davis GL, Lau JY. Plasma glutathione concentration in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1995;2:211-4.
76. Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998;25:993-7.
77. Asnis GM, De la Garza R, 2nd, Kohn SR, Reinus JF, Henderson M, Shah J. IFN-induced depression: a role for NSAIDs. *Psychopharmacol Bull* 2003;37:29-50.

XI. ANEXOS

CULTIVO CELULAR

1 . Mantenimiento de las líneas celulares

Material

- Cultivos celulares
- Medio de cultivo DMEM marca GIBCO #12800-058, 1L
- Suero bovino fetal (SBF) marca GIBCO #16000-044, 500ml
- Tripsina 1X marca GIBCO #15050-057, 500ml
- Antibiótico Penicilina/estreptomicina marca GIBCO #15070-063, 100ml
- Aminoácidos no esenciales (células Huh7 replicón) solución 10Mm (100X) marca GIBCO #11140-050, 100ml
- Geneticina G-418 (células Huh7 replicón) marca GIBCO #11811-023, 1g
- Botellas ó placas para cultivo celular
- Pipetas desechables de 5 y 10 ml

Equipo

- Incubadora de CO₂
- Centrifuga

Protocolo

1. Retirar el medio de cultivo de la botella o placa de células confluyente.
2. Adicionar 3 ml de Tripsina 1X a las botellas T-75 cm² y colocar la botella en la incubadora a 37°C durante 10 a 15 minutos ó el tiempo necesario para que las células se despeguen de la superficie de la botella de cultivo.
3. Colectar las células en un tubo falcón de 15 ml y centrifugar durante 5 a 7 minutos a 2000 rpm.
4. Retirar la tripsina y resuspender suavemente el botón de células con 1 ml de medio completo (SBF + Antibiótico).
5. Tomar de las células en suspensión la alícuota necesaria y colocarla en las botellas a las que previamente se les adicionó medio de cultivo completo.

Observaciones

- Es necesario suplementar el medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) con los siguientes reactivos:
 - A) 1% de antibiótico (100 U/ml de Penicilina y 100 µg/ml de Estreptomicina).
 - B) 10% de Suero Bovino Fetal (SBF).
 - C) Solo a las células Huh7 que expresan constitutivamente el replicón del VHC se les adiciona además 1% de aminoácidos no esenciales y 500 µg de Geneticina (G-418).
- Se recomienda que al momento de utilizar la tripsina, el SBF, el antibiótico, así como, el medio de cultivo estén a temperatura ambiente.
- Las células crecen a una temperatura de 37°C y a una atmósfera húmeda de 5% de CO₂.

2. Conteo Celular

Material

- Cultivos celulares
- Medio de cultivo DMEM marca GIBCO #12800-058, 1L
- Suero bovino fetal (SBF) marca GIBCO #16000-044, 500ml
- Tripsina 1X marca GIBCO #15050-057, 500ml
- Antibiótico Penicilina/estreptomina marca GIBCO #15070-063, 100ml
- Azul Tripano marca GIBCO #15250-061, 100ml
- Aminoácidos no esenciales (células Huh7 replicón) solución 10Mm (100X) marca GIBCO #11140-050, 100ml
- Geneticina G-418 (células Huh7 replicón) marca GIBCO #11811-023, 1g
- Botellas ó placas para cultivo celular
- Pipetas desechables de 5 y 10 ml

Equipo

- Centrifuga
- Cámara de Neubauer
- Incubadora de CO₂

Protocolo

1. Retirar el medio de cultivo de la botella o placa de células confluente.
2. Adicionar 3 ml de Tripsina 1X a las botellas T-75 cm² y colocar la botella en la incubadora a 37°C durante 10 a 15 minutos ó el tiempo necesario para que las células se despeguen de la superficie de la botella de cultivo.
3. Colectar las células en un tubo falcón de 15 ml y centrifugar durante 5 a 7 minutos a 2,000 rpm.
4. Retirar la tripsina y resuspender suavemente el botón de células con 1 ml de medio suplementado con SBF y antibiótico.
5. Hacer diluciones como se describe a continuación:

Dilución 1:4

Reactivos	Cantidad
Células en suspensión	10 µl
Azul tripano	10 µ
Medio de cultivo solo	20 µ

Dilución 1:8

Reactivos	Cantidad
Células en suspensión	10 µl
Azul tripano	10 µ
Medio de cultivo solo	60 µ

6. Colocar 10 µl de la dilución en la cámara de Neubauer y contar las células que se observen en cada cuadrante y sacar un promedio del conteo celular.

7. Realizar el siguiente calculo:

$$\text{Células/ml} = (\text{No. de células promedio}) (1 \times 10^4) (\text{Factor de dilución})$$

8. Colocar el número de células correspondientes en cada placa e incubarlas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta que vayan a utilizarse.

3. Viabilidad Celular (Azul Alamar)

Fundamento

Los índices de NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN y NADH/NAD aumentan durante la proliferación celular, estos metabolitos intermediarios reducen las sales de tetrazolium y el reactivo azul alamar. Por lo tanto, si las células están creciendo el reactivo azul alamar es reducido cambiando de color azul (forma oxidada 570nm) a rosa (forma reducida 600nm).

Material

- Cultivos celulares en placas de 96 pozos.
- Reactivo azul alamar.

Equipo

- Lector de placas de 96 pozos.
- Filtros de 570 y 600 nm.

Protocolo

1. Sembrar 15,000 células por pozo en una placa de 96
2. Al siguiente día realizar la exposición con el fármaco en estudio
3. Incubar las células durante 24, 48 y 72 horas según sea el caso
4. Post-tratamiento retirar el medio de cultivo y adicionar 200µl de medio completo (10% de SBF y 1% de antibiótico) más el 10% del reactivo azul alamar a cada pozo (20µl de azul + 180µl de medio completo)
5. Incubar las células entre 3 y 4 horas a 37°C
6. Leer absorbancias a 570 y 600nm

Observaciones

- El tiempo de incubación con el reactivo azul alamar depende del tipo celular
- En la placa se tiene que colocar también un **blanco** que corresponde al medio de cultivo + azul alamar. Con este resultado se harán correcciones en los cálculos

4. Congelación de Células.

Material

- Crioviales marca Corning #430659, 2ml
- Medio de cultivo DMEM marca GIBCO #12800-058, 1L
- Suero bovino fetal (SBF) marca GIBCO #16000-044, 500ml
- Tripsina 1X marca GIBCO #15050-057, 500ml
- Antibiótico Penicilina/estreptomicina marca GIBCO #15070-063, 100ml
- DMSO marca SIGMA #D2650, 100ml
- Hielera

Equipo

- Incubadora de CO₂
- Centrifuga

Protocolo

1. Seguir el mismo protocolo de mantenimiento de líneas celulares hasta la tripsinización.
2. Colectar las células en un tubo falcón de 15 ml y centrifugar durante 5 a 7 minutos a 2000 rpm.
3. Retirar la tripsina y resuspender suavemente el botón de células con SBF (92.5%). Cada criovial debe contener 7.5% de DMSO (dimetilsulfoxido). De tal manera que en cada criovial queda una alícuota de 1ml.
4. Almacenar las células a -70°C por dos a tres horas, previo al almacenamiento definitivo en nitrógeno (fase de vapor).

5. Descongelación de Células.

Material

- Crioviales con células
- Medio de cultivo DMEM marca GIBCO #12800-058, 1L
- Suero bovino fetal (SBF) marca GIBCO #16000-044, 500ml
- Antibiótico Penicilina/estreptomina marca GIBCO #15070-063, 100ml
- Aminoácidos no esenciales (células Huh7 replicón) solución 10Mm (100X) marca GIBCO #11140-050, 100ml
- Geneticina G-418 (células Huh7 replicón) marca GIBCO #11811-023, 1g
- Hielera

Equipo

- Incubadora de CO₂
- Centrifuga
- Botellas para cultivo celular

Protocolo

1. Descongelar inmediatamente por inmersión en baño de agua a 37°C.
2. Colocar el contenido del vial en un tubo falcon de 15 ml, el cual debe contener 5 ml de medio completo (SBF + Antibiótico).
3. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 min.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla con 1 ml de medio completo.
5. Sembrar en una botella de 75 cm² al que previamente se ha adicionado 9 ml de medio de cultivo completo.
6. Incubar a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂.
7. Observar al siguiente día.

PROTEINAS

6. Obtención de Extractos proteicos

Material

- Cultivos celulares
- Buffer de lisis 1X
- Tableta de inhibidores de proteasas marca Roche #1697498
- Escrapers de 25cm marca Corning #3010, 100 piezas

Equipo

- Centrifuga refrigerada

Observaciones

- El PBS 1X + EDTA 1mM se utiliza para despegar las células que crecen en monocapa. En el caso de células en suspensión únicamente se empastillan por centrifugación.
- En las placas de 100 x 20 mm se utilizan 2 ml del buffer PBS 1X + EDTA 1mM y se empastillan a 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C.
- Si la confluencia celular es menor del 30% se utilizan 20 µl de buffer de lisis, si la confluencia es de aproximadamente entre 50-60% se utilizan de 40 a 60 µl de buffer, si la confluencia es del 100% o superior se emplean de 200 a 250 µl de buffer, respectivamente.
- El buffer de lisis completo 1X es estable hasta por 2 semanas.

Soluciones

1. PBS 10X

Reactivos	Cantidad	[Final]
NaCl	80 g	8%
KCl	2 g	0.2%
Na ₂ HPO ₄	14.4 g	1.44%
KH ₂ PO ₄	2.4 g	0.24%

Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 litro con agua destilada

2. PBS 1X + EDTA 1 mM

[Inicial]	Cantidad	[Final]
PBS 10X	10 ml	1X
EDTA 0.5 M pH 8.0	200 μ l	1 mM

Ajustar a 100 ml con agua destilada

3. Buffer de lisis 5X

[Inicial]	Cantidad	[Final]
Triton X-100 100%	5 ml	5%
Tris-HCl 1 M pH 7.5	5 ml	50 mM
KCl 2 M	12.5 ml	250 mM
MgCl ₂ 1 M	1 ml	10 mM

Aforar a 100 ml con agua destilada

4. Tris-HCL pH 7.5 1M

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris	12.11 g	1M

Ajustar a pH 7.5 con HCl y aforar a 100ml con agua destilada

5. KCl 2M

Reactivos	Cantidad	[Final]
KCl	14.91 g	2M

Aforar a 100ml con agua destilada

6. MgCl₂ 1M

Reactivos	Cantidad	[Final]
MgCl ₂	4.76 g	1M

Aforar a 50ml con agua destilada

7. Soluciones stock de Inhibidores de Proteasas

Reactivos	[Inicial]
Aprotinina	10 mg/ml
Leupeptina	10 mg/ml
Pepstatina	1 mg/ml
Ditiotritol (DTT)	0.1 M
Fluoruro de Sodio	500 mM
Vanadato de Sodio	100 mM
Microcistina	0.4 mM
Ácido okadaico	100 μ M
Tableta de Inhibidores de proteasas	1 tableta en 1 ml de agua

8. PMSF 0.5 M

Reactivo	Cantidad
PMSF	0.0871 g

Aforar a 1 ml con isopropanol

9. Buffer de Lisis Completo 1X (solución de trabajo)

Reactivos	Cantidad
Buffer de lisis 5X	2 ml
Stock de Aprotinina	3 μ l
Stock de Leupeptina	1 μ l
Stock de Pepstatina	10 μ l
Stock de Ditiotritol (DTT)	10 μ l
Stock de Fluoruro de Sodio	1 ml
Stock de Vanadato de Sodio	10 μ l
Stock de Microcistina	6.25 μ l
Stock de Ácido okadaico	0.5 μ l
Stock de Inhibidores de proteasas	400 μ l
PMSF 0.5 M	10 μ L

Aforar a 10 ml con agua destilada

7. Cuantificación de la Concentración de proteínas Método de Bradford Microensayo (1 mL)

Fundamento

Se determina la concentración de proteína soluble a través del agregado de un colorante ácido a la solución de proteínas y su posterior lectura de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. El colorante Azul de Coomassie se une a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas (principalmente arginina).

Material

- Estándar de Albúmina Serica Bovina (BSA) de 100 mg/ml
- Celdas de plástico marca Daigger #NX6806A
- Extractos de Proteínas
- Reactivo de Bradford marca BIO-RAD #500-0006, 450 ml

Protocolo

1. Preparar en agua estéril una solución stock de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a una concentración de 100 mg/ml.
2. Hacer una dilución de 1:50 del stock de 100 mg/ml, para que quede a una concentración final de 2 mg/ml ó 2 µg/µl.
3. Preparar directamente en las celdas de plástico los siguientes estándares empleando el stock diluido de BSA:

Estándar	µl del estándar de 2 mg/ ml	µl del agua	Concentración µg/µl
1	0	800	0
2	1	799	2
3	2.5	797.5	5
4	5	795	10
5	7.5	792.5	15

4. Adicionar 200 µl del reactivo de Bradford concentrado a cada celda y mezclar.

5. Incubar las celdas a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las absorbancias aumentan con el tiempo de incubación, por lo que **no** se recomienda incubar las muestras por más de una hora.
6. Medir absorbancia a 595 nm en el biofotómetro (Eppendorf).

Observaciones

- Para determinar la concentración de proteínas en las muestras problema se colocan 2 μ l del extracto de proteínas más 798 μ l de agua. La concentración que se obtenga en μ g/ml se divide entre dos, ya que se utilizaron 2 μ l de cada una. La concentración se reporta en μ g/ μ l.
- En el biofotómetro se colocan las unidades de μ g/ml y regresión no lineal.
- La linealidad del método es de 1 – 25 μ g/ ml.

8. Electroforesis en gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Fundamento

Fue descrito por Laemmli en 1970. Las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas en base a su tamaño.

Material

- Preparar hoja de trabajo
- Muestras cuantificadas y desnaturalizadas
- Soluciones para preparar el gel de poliacrilamida

Equipo

- Cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN 3 Cell marca BIO-RAD #165-3322
- Fuente de poder

Protocolo

1. Ensamblar el cassette del gel conforme a las especificaciones de la compañía BIO-RAD (Mini-Protean 3 Cell).
2. Preparar la solución del gel separador (separating gel) con la concentración apropiada de acrilamida.
3. Aplicar con una pipeta serológica 4.5 ml de la solución del gel separador al vidrio que contiene el separador de 1 mm, y cubrir el gel con Isopropanol absoluto para favorecer la polimerización. Después, de 10 minutos invertir el gel para remover el Isopropanol.
4. Preparar la solución del gel concentrador (stacking gel), vaciarlo hasta el límite del vidrio e inmediatamente colocar el peine.
5. Colocar el gel en la cámara de corrimiento y ensamblarlo para después añadir el buffer de corrida 1X.
6. Retirar el peine y lavar los pocillos con buffer para eliminar la acrilamida que no haya polimerizado.

7. Cargar las muestras que previamente deben ser mezcladas con buffer de desnaturalización en una relación 1:1, y calentarlas a 95°C por 4 minutos.
8. Correr el gel a 80V por aproximadamente 2.5 horas.

Soluciones

1. Acrilamida/ Bisacrilamida

Reactivos	Cantidad
Acrilamida 30% T	87.6 g (29.2 g/ 100 ml)
Bisacrilamida (N'N'-bis-metilen-acrilamida) 2.67% C	2.4 g (0.8 g/100 ml)

Aforar a 300 ml con agua destilada, almacenar a 4°C y protegerla de la luz

2. SDS 10% (w/ v)

Reactivo	Cantidad
SDS	10 g

Aforar a 100 ml con agua destilada. El SDS es tóxico, por lo que se recomienda utilizar cubrebocas para pesarlo y prepararlo.

3. Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (buffer separador)

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris base	27.25 g	1.5 M
SDS	0.6 g	0.4%

Ajustar pH 8.8 con HCl y aforar a 150 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C.

Reactivo	Cantidad	[Final]
Tris-HCl 1 M pH 6.8	12.50 ml	130 mM
Glicerol	20 ml	20%
SDS 10%	20 ml	2%
Azul de Bromofenol	0.1 g	0.1%
β -mercaptoetanol	1 ml	1%
Volumen Total	53.5 ml	

4. Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (buffer concentrador)

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris base	9 g	0.5 M
SDS	0.6 g	0.4%

Ajustar pH 6.8 con HCl y aforar a 150 ml con agua destilada. Almacenar a 4°C.

5. Buffer de Desnaturalización 4x

Diluir las muestras 1:1 con el buffer y calentarlas a 95°C por 4 minutos. Almacenar el buffer de desnaturalización a 4°C.

6. Buffer de Corrida 5X

Reactivos	Cantidad	[Final]
Tris base	15.1 g	125 mM
Glicina	94 g	1.25 M
SDS	5 g	0.5%

Aforar a 1 litro con agua destilada y almacenar a 4°C

7. Persulfato de amonio (PSA) 10%

Reactivo	Cantidad
PSA	100 mg

Disolver en 1 ml de agua destilada y almacenar a -20°C

8. Preparación del Gel de Poliacrilamida (10 ml)

Gel	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	12%	14%
H ₂ O	6.1	5.7	5.4	5.1	4.7	4.4	4.1	3.4	2.7
A/B 30% (ml)	1.3	1.7	2.0	2.3	2.7	3.0	3.3	4.0	4.7
*Buffer (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
SDS 10% (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
PSA 10% (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
TEMED (μl)	20	20	20	20	20	20	20	20	20

*Gel Separador- Tris-HCl pH 8.8 1.5M

*Gel Concentrador- Tris-HCl pH 6.8 0.5M

Las cantidades de PSA y TEMED deben ser ajustadas dependiendo del volumen de gel que se prepara.

9. Tinción del gel de Poliacrilamida Azul de Coomassie

Material

- Solución de Tinción
- Solución para desteñir
- Plástico adherente (saran wrap)

Protocolo

1. Teñir el gel de poliacrilamida con la solución de azul de coomassie durante 30 minutos.
2. Desteñir el gel por 30 minutos o toda la noche con varios cambios de solución para desteñir.

Soluciones

1. Solución de Tinción

Reactivos	Cantidad	[Final]
Metanol	100 ml	50%
Ácido acético glacial	14 ml	7%
Azul de Coomassie R-250	0.1 g	0.05%

Aforar a 200 ml con agua destilada

2. Solución para desteñir

Reactivos	Cantidad	[Final]
Metanol	66 ml	16.5%
Ácido acético glacial	20 ml	5%

Aforar a 400 ml con agua destilada

10. Transferencia del gel a la membrana (Western Transfer)

Material

- Papel filtro cortado
- Membrana Hybond-P PVDF marca Amersham Biosciences #RPN303F
- Pipeta rolling
- Buffer de transferencia 1X helado
- Tijeras
- Set de transferencia
- Hoja para bisturí

Equipo

- Placa de agitación
- Agitador magnético
- Fuente de poder
- Pinzas

Protocolo

1. Recortar la membrana Hybond-P PVDF (Amersham Biosciences) con las dimensiones de 6.0 cm de largo x 8 cm de largo.
2. Sumergir la membrana en metanol 100% (v/v) por 5 minutos.
3. Lavar la membrana con agua destilada por 5 minutos y equilibrar la membrana con buffer de transferencia 1X durante 10 minutos. Colocar también en el buffer de transferencia dos piezas de papel filtro.
4. Remover y descartar el gel concentrador (stacking gel).
5. Colocar sobre el gel un papel filtro húmedo y despegar el gel del vidrio. Colocarlo sobre la esponja del set de transferencia.
6. Armar el sándwich colocando sobre el gel la membrana previamente equilibrada. Eliminar burbujas con la pipeta rolling.
7. Colocar un papel filtro humedecido sobre la membrana, y enseguida colocar la otra esponja (ver figura 1).
8. Transferir a 4°C a 100V durante 1 hora, ó a 50V por 3 h ó a 35V toda la noche.

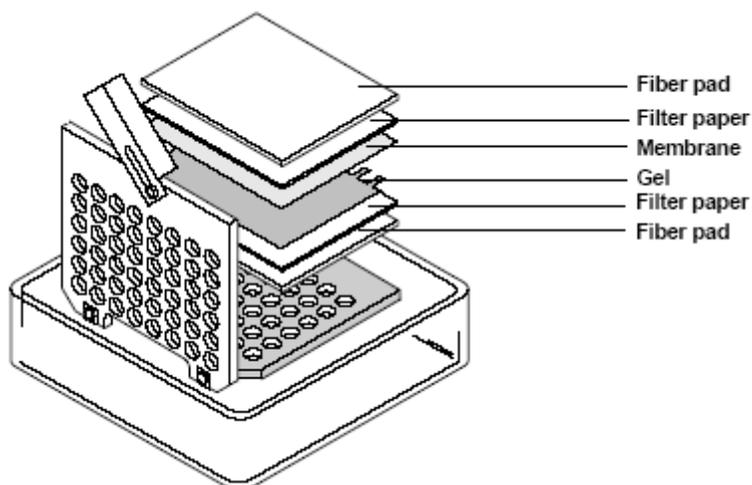


Figura 1. Esquema del Sándwich de transferencia

Soluciones

1. Buffer de Transferencia 5X

Reactivos	Cantidad
Glicina	14.5 g
Tris base	29 g
Metanol	200 ml

Aforar a 1litro con agua destilada. Almacenar a 4°C

Observaciones

- Evitar dejar burbujas para que no se formen gradientes en la transferencia.
- La transferencia se efectúa en cuarto frío y con agitación.
- El buffer de transferencia se utiliza a 1X y debe estar frío.
- No olvidar congelar el ice que se coloca en la cámara de transferencia.

11. Western blot

Material

- Buffer de bloqueo
- Plástico adherente
- Anticuerpos diluidos
- Leche descremada en polvo
- Amresco #0860
- Albúmina sérica bovina
- Buffer de lavados PBS-T

Equipo

- Placa de agitación
- Pinzas

Protocolo

1. Después de la transferencia teñir la membrana con el reactivo rojo de Ponceau durante 5 minutos
2. Enjuagar la membrana teñida 3 veces con buffer PBS-T 1X, y marcar con lápiz los pesos moleculares del marcador.
3. Sumergir la membrana en el buffer de bloqueo 1X a 4°C durante 1h o toda la noche con agitación.
4. Posteriormente, lavar la membrana 2 veces con PBST 1X por 10 minutos cada uno de los lavados a temperatura ambiente.
5. Incubar la membrana con el anticuerpo primario (1:1000) toda la noche a 4°C y con agitación.
6. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
7. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario (1:1000) por 2h a 4°C y con agitación.
8. Lavar la membrana 5 veces con el buffer PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.

9. Al terminar los lavados preparar el material necesario para efectuar el desarrollo de Quimioluminiscencia.

Soluciones

1. PBS 10X

Reactivos	Cantidad	[Final]
NaCl	80 g	8%
KCl	2 g	0.2%
Na ₂ HPO ₄	14.4 g	1.44%
KH ₂ PO ₄	2.4 g	0.24%

Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 Litro con agua destilada

2. Buffer de Bloqueo con LECHE

Reactivos	Cantidad
Leche descremada en polvo	1.2 g
PBS 10X	4 ml
Triton X-100 100%	0.2 ml
Ácida de Sodio (NaN ₃) 2%	0.4 ml

Aforar a 40 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

2. Buffer de Bloqueo con ÁLBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA)

Reactivos	Cantidad
BSA	1.5 g
PBS 10X	3 ml
Triton X-100 100%	30 µl

Aforar a 30 ml con agua destilada y almacenar a 4°C.

3. Buffer de lavados PBS-T 1X para LECHE

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	40 ml
Triton X-100 100%	2 ml

Aforar a 400 ml con agua destilada

3. Buffer de lavados PBS-T 1X para BSA

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	40 ml
Triton X-100 100%	0.4 ml

Aforar a 400 ml con agua destilada

4. Solución de Ponceau 0.1%

Reactivos	Cantidad
Ponceau S	0.2 g
Ácido acético	10 ml

Aforar a 200 ml con agua destilada

5. Anticuerpo dilución 1:1000 con LECHE

Reactivos	Cantidad
Anticuerpo	10 μ l
Buffer de Bloqueo con LECHE	10 ml

6. Anticuerpo dilución 1:1000 con BSA

Reactivos	Cantidad
PBS 10X	1 ml
BSA 1%	0.1 ml

Aforar a 10 ml con agua destilada y adicionar 10 μ l del anticuerpo

Observaciones

- El anticuerpo diluido de 1:1000 se puede almacenar a 4°C para poderlo reutilizar hasta 3 veces.
- Los anticuerpos contra NS5, actina y NPT II se recomiendan prepararlos a una dilución de 1:1000.
- Los lavados son a temperatura ambiente y las incubaciones con los anticuerpos son a 4°C.
- Los anticuerpos se pueden preparar en leche o en BSA.
- La solución de Ponceau se puede reutilizar.

12. Quimioluminiscencia

Material

- Membrana Hybond-P PVDF marca Amersham Biosciences #RPN303F
- Kit de Quimioluminiscencia marca Amersham Biosciences #RPN2132
- Anticuerpo Monoclonal anti-NS5a marca Biodesign Internacional #C65388M
- Anticuerpo Monoclonal anti-NPT-II marca Cortex Biochem #CR1112RP
- Anticuerpo Monoclonal anti-Actin marca MP Biomedicals #69100
- Anticuerpo Secundario anti-Rabbit marca Promega #W401B
- Anticuerpo Secundario anti-Mouse marca Promega #W402B
- Tijeras, plástico adherente, pinzas

Equipo

- Chasis
- Revelador automático

Protocolo

1. Preparar la solución de detección mezclando la solución A y B del kit de Quimioluminiscencia en una relación 1:1. La cantidad requerida de esta mezcla es 0.1 ml/cm² de membrana.
2. Eliminar el buffer de lavado del recipiente que contiene a la membrana y colocar la solución de detección sobre la membrana.
3. Incubar la membrana en la solución de detección durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Escurrir la membrana para eliminar el exceso de solución de detección.
5. Colocar la membrana sobre el chasis y sobre ella colocar un pedazo de plástico adherente.
6. Exponer la membrana a la radiografía por segundos o minutos.
7. Colocar la radiografía en el revelador automático.

Soluciones

1. Solución de detección

Reactivos	Cantidad
Solución A	3 ml
Solución B	75 µl

Observaciones

- Realizar el revelado en el cuarto oscuro.
- El volumen requerido de la mezcla de detección es 0.1ml/cm² de membrana.

13. Eliminación de Anticuerpos (Stripping)

Material

- Membrana Hybond-P PVDF
- Buffer Stripping 1X
- Leche descremada en polvo
- Pinzas

Protocolo

1. Sumergir la membrana PVDF en el buffer de Stripping 1X.
2. Incubar la membrana a 50°C durante 30 minutos con agitación.
3. Lavar la membrana 4 veces con PBS-T 1X por 10 minutos cada una y a temperatura ambiente.
4. Bloquear la membrana en buffer de bloqueo 1X durante 1 hora a 4°C.
5. Repetir el procedimiento de inmunodetección (western blot).

Soluciones

1. Buffer stripping 1X

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl 1M pH 6.7	31.25 ml
SDS 10%	100 ml
β-mercaptoetanol	3.5 ml

Aforar a 500ml con agua destilada

Observaciones

- El procedimiento de stripping se recomienda realizarlo en una incubadora para hibridación.

14. Prostaglandinas

Se basa en una competencia entre PGE₂ no marcado (muestra o estándar) y PGE₂ marcado con peroxidasa por unirse al anticuerpo primario contra PGE₂. Si no hay PGE₂ debe observarse un color azul previo a la adición de ácido sulfúrico, por lo tanto, si hay PGE₂ no debe haber desarrollo de color. Las absorbancia se leen a 450 nm.

Material

- Cultivos celulares.
- Placas de 96 pozos.
- Kit para PGE₂ marca Amersham Biosciencias #RPN222.

Equipo

- Espectrofotómetro de placa de 96 pozos con filtro de 450 nm.

Contrucción de la Curva Estándar

1. Colocar 3.9 ml del buffer de lisis 1 diluido (solución de trabajo) en un tubo falcón de 15 ml.
2. Adicionar 100 µl del stock del estándar (provisto por el kit) al tubo falcón de 15 ml y mezclar vigorosamente. Se obtendrá una solución estándar de 320 pg/50 µl.
3. Rotular 7 tubos eppendorf de 1.5 ml con las siguientes concentraciones: 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 pg.
4. Colocar 500 µl del buffer de lisis 1 diluido (solución de trabajo) en cada tubo eppendorf.
5. Transferir 500 µl de la solución estándar de 320 pg al tubo marcado como 16 pg y mezclar vigorosamente.
6. Posteriormente, tomar 500 µl del tubo de 160 pg y colocarlo en el tubo marcado como 80 pg. Repetir este paso sucesivamente hasta obtener la ultima dilución de 2.5 pg.
7. Colocar 50 µl de cada estándar en el pozo correspondiente.

Protocolo

1. Colocar 50 μ l del buffer de lisis 1 diluido y 50 μ l del buffer de lisis 2 diluido (soluciones de trabajo) en los pozos que van a hacer NSB (non-specific binding).
2. Colocar 50 μ l del buffer de lisis 1 diluido (solución de trabajo) en el pozo que va a hacer el estándar cero.
3. Colocar 50 μ l de cada una de las soluciones estándar en los pozos signados.
4. Colocar 50 μ l del anticuerpo primario diluido en cada pozo, excepto en el blanco y en el NSB.
5. Colocar 50 μ l del anticuerpo primario diluido en cada pozo, excepto en el blanco y en el NSB.
6. Tapar la placa e incubarla a temperatura ambiente (20-25°C) por 1 hora con agitación continua.
7. Retirar el líquido y lavar 4 veces la placa con buffer de lavado asegurándose que todos los pozos queden completamente llenos con buffer.
8. Voltear la placa para eliminar el buffer de lavado y secar la placa sobre unas sanita. Repetir el proceso tres veces más.
9. Colocar 150 μ l del sustrato TMB en cada pozo. Tapar la placa e incubarla 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C).
10. Se desarrollará un color azul que puede leerse a 630 nm. Sin embargo, se recomienda que la reacción sea detenida con la adición de 100 μ l de ácido sulfúrico 1M a cada pozo.
11. La densidad óptica debe ser leída a 450 nm durante los primeros 30 minutos después de la adición de ácido sulfúrico.

Preparación de Soluciones

- **Buffer de ensayo**

Transferir el contenido de la botella del kit a otro recipiente. Aforar a 500 ml con agua destilada, y mezclar vigorosamente. Por lo tanto, se obtiene buffer de ensayo diluido.

- **Buffer de lisis 1**

Transferir el contenido del frasco (reactivo sólido) a otro recipiente, para ello se adiciona 60 ml del buffer de ensayo diluido, y se hacen repetidos lavados. Luego, se ajusta a un volumen final de 80 ml, y se mezcla vigorosamente. La solución tiene una concentración final de 2.5% de Dodecitrimetil bromuro de amonio. Esta solución es el buffer A. Tomar 10 ml del buffer A y aforarlo a 100 ml con agua destilada. Obteniendo una solución con una concentración final de 0.25% de Dodecitrimetil bromuro de amonio. Esta solución es el buffer 1 diluido (solución de trabajo).

- **Buffer de lisis 2**

Transferir el contenido del frasco (reactivo sólido) a otro recipiente, para ello se adiciona 80 ml del buffer de ensayo diluido, y se hacen repetidos lavados. Luego, se ajusta a un volumen final de 100 ml, y se mezcla vigorosamente. La solución contiene 5% del reactivo de lisis 2. Este es el buffer B. Tomar 10 ml del buffer B y aforarlo con 33.3 ml de buffer de ensayo diluido para dar lugar a una solución con una concentración final de 1.5% de buffer de lisis 2. Esta solución es el buffer diluido 2 (solución de trabajo).

- **Conjugado de Prostaglandinas E₂**

Agregar 6 ml del buffer de lisis 2 diluido (solución de trabajo) y mezclar suavemente hasta que el contenido este completamente disuelto. Tomar 2 ml del anticuerpo diluido y agregarle 4 ml del buffer de lisis 2 diluido (solución de trabajo).

- **Anticuerpo**

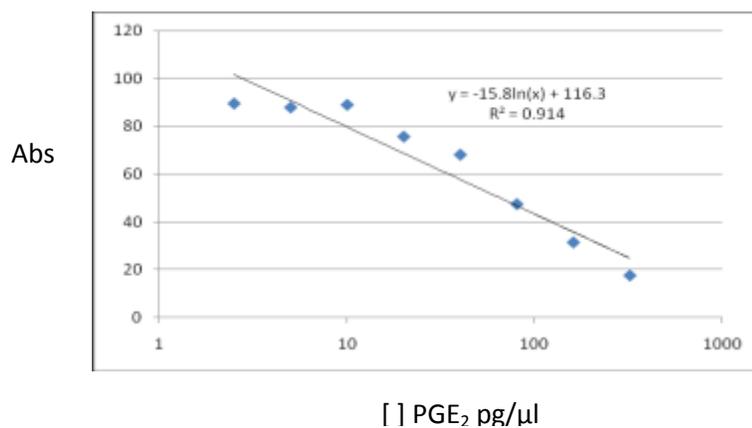
Agregar 6 ml del buffer de lisis 2 (solución de trabajo) y mezclar suavemente hasta que el contenido este completamente disuelto. Tomar 4 ml del anticuerpo diluido y agregarle 2 ml del reactivo de lisis 2 diluido (solución de trabajo).

- **Buffer de lavado**

Transferir el contenido de la botella del kit a otro recipiente. Aforar a 500 ml con agua destilada, y mezclar vigorosamente. Por lo tanto, se obtiene buffer de lavado diluido.

CALCULOS

Curva Estandar	Abs. 450 nm	Promedio Abs	Abs- NSB	Abs mues ó st/st 0 x 100 %B/B0
Blanco	0.05	0.05		
	0.05			
NSB	0.195	0.195		
	0.195			
0	0.396 0.404	0.4	0.265	100
2.5	0.394 0.373	0.3835	0.2485	89.7112
5	0.373 0.385	0.379	0.244	88.0866
10	0.372 0.392	0.382	0.247	89.1697
20	0.335 0.355	0.345	0.21	75.8123
40	0.321 0.327	0.324	0.189	68.231
80	0.252 0.281	0.2665	0.1315	47.4729
160	0.215 0.229	0.222	0.087	31.4079
320	0.177 0.19	0.1835	0.0485	17.509



Observaciones

- La concentración de PGE₂ se reporta en unidades de pg/pozo, y se determina en base a la ecuación corregida que se obtiene de la curva estándar. La relación entre la concentración de PGE₂ y absorbancia es inversa, mayor PGE₂ menor absorbancia.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente.
- Para preparar los reactivos se puede utilizar tanto agua destilada como agua desionizada.
- Es importante que la placa de 96 pozos del kit este a temperatura ambiente.
- Es importante utilizar puntillas limpias en cada dilución.
- Los estándares deben utilizarse dentro de la primera hora después de su preparación.
- El estándar y los anticuerpos reconstituidos deben ser almacenados de -15°C a -30°C, y se pueden re-utilizar hasta dos semanas.

15. Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Fundamento

El ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con el malondialdehído (MDA) un producto de peroxidación lipídica, generando un compuesto que es detectable por fluorescencia. Sin embargo, el TBA también puede reaccionar con un sin número de sustancias como otros productos de oxidación lipídica, pigmentos biliares, aminoácidos y azúcares que generan sustancias que interfieren con la lectura de TBA y la hacen menos específica. Por lo consiguiente se realizó una extracción de lípidos antes de realizar la determinación.

Material

- Cloruro de Manganeso tetrahidratado de la marca Merck
- Heparina de Sodio de la marca Sigma #H-7005.
- Tubos falcón de 15 y 50 ml de la marca cornig.
- TBARS Assay Kit de la marca OXltek #0801192.

Equipo

Fluorometro LS-55, marca Perkin Elmer

Protocolo de Extracción de lípidos LDL/VLDL

1. Se preparó una solución de 1.06 M de cloruro de manganeso disuelto en agua destilada.
2. Se preparó una solución de 40,000 USP/ml de heparina de sodio disuelta en agua destilada.
3. Una vez preparados estos dos reactivos se procedió a preparar la solución de trabajo la cual consiste en mezclar 300 µl de heparina de sodio por cada 5 ml de cloruro de manganeso 1.06 M (solución de trabajo).
4. Se adicionaron 500 µl de solución salina a un tubo eppendorf de 1.5 ml esteril.
5. Posteriormente se adicionaron al tubo 500 µl de suero.
6. Después se adicionaron 300 µl de la solución de trabajo al suero previamente diluido.
7. Se incubó la mezcla por 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Posteriormente se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 8000 rpm.

9. Se decantó la muestra.
10. Se resuspendió la pastilla en 500 µl de solución salina estéril.
11. La muestra se sónico por 5 segundos en hielo.
12. Se almacenó a -70°C hasta su uso.

Soluciones

- **TBA/Buffer**

Diluir un vial de Acido Tiobarbiturico con una botella del diluyente 1 de TBARS. Mezclar vigorosamente. Adicionar una botella completa del diluyente 2 de TBARS. Mezclar vigorosamente hasta que se observe una disolución completa.

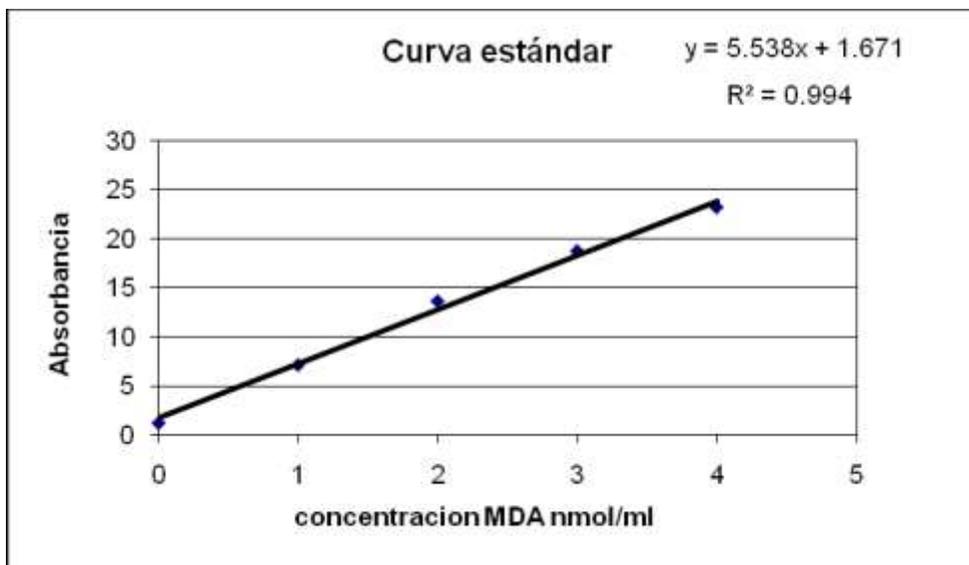
- **MDA Estándar para fluorometro**

Se realizó una dilución 1:10 del estándar de MDA. Primero se colocaron 1.8 ml del diluyente de MDA y 0.2 ml del estándar de MDA. Se mezcló vigorosamente. El esquema de dilución se muestra en la tabla:

No. del Estándar	Concentración MDA	Vol. del estándar de MDA 1:10	Vol. Del diluyente
4	4 nmol/ml	400 µl	600 µl
3	3 nmol/ml	300 µl	700 µl
2	2 nmol/ml	200 µl	800 µl
1	1 nmol/ml	100 µl	900 µl
0	0 nmol/ml	0 µl	1000 µl

- **Curva Estándar TBARS**

No. del Estándar	Concentración MDA (nmol/ml)	Fluorescencia
4	4	23.1265
3	3	18.687
2	2	13.5835
1	1	7.12
0	0	1.22



Observaciones

- Los reactivos se preparan en el momento de realizar la determinación.
- La temperatura de incubación debe ser exactamente de 95°C, de lo contrario se observaran variaciones en el resultado y baja reproducibilidad.
- Es necesario ser minuciosos a la hora del pipeteo debido a que es una técnica muy sensible.

16. Superóxido Dismutasa (SOD)

Fundamento

La superóxido Dismutasa es una metaloenzima que cataliza la dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. El kit utiliza una sal de tetrazolio para la detección del radical superóxido generado por la xantina oxidasa y la hipoxantina. El kit mide SOD total (tres tipos de enzima Cu/Zn, Mn y Fe).

Material

- Superoxide Dismutase Assay Kit #706002.
- Tubos falcón de 15 y 50 ml de la marca corining.

Equipo

Espectrofotómetro de placa Biotek ELx800 con filtro de 450 nm

Soluciones

- **Buffer de ensayo (10x)**

Se diluyeron 3 ml del buffer de ensayo concentrado con 27 ml de agua miliQ. Este buffer de ensayo (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, contiene 0.1 mM ácido dietilenetraminapentaacético (DPTA) y 0.1 mM hipoxantina) se utilizó para preparar el radical detector. Se almacenó a 4°C y es estable por 2 meses.

- **Buffer de muestra (10x)**

Se diluyeron 2 ml del buffer de muestra concentrado en 18 ml de agua miliQ. Este buffer de muestra (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) se utilizó para preparar los estándares SOD y diluir la xantina oxidasa y las muestras previamente de ser realizado el ensayo. Se almacenó a 4°C y es estable por 2 meses.

- **Radical Detector**

Este vial contiene una sal de tetrazolio. Se transfirieron 50 µl de la solución que provee el kit y se diluyó con 19.95 ml del buffer de ensayo. Se cubrió con papel aluminio y el reactivo es estable por 2 horas.

- **Estándar SOD**

El vial contiene una solución con SOD de eritrocitos de bovino (Cu/Zn). Se preparó la solución stock de SOD diluyendo 20 µl del SOD estándar en 1.98 ml del buffer de muestra.

Para preparar los estándares previamente se etiquetaron 7 tubos de la A-G y se colocaron las cantidades mostradas en la siguiente tabla:

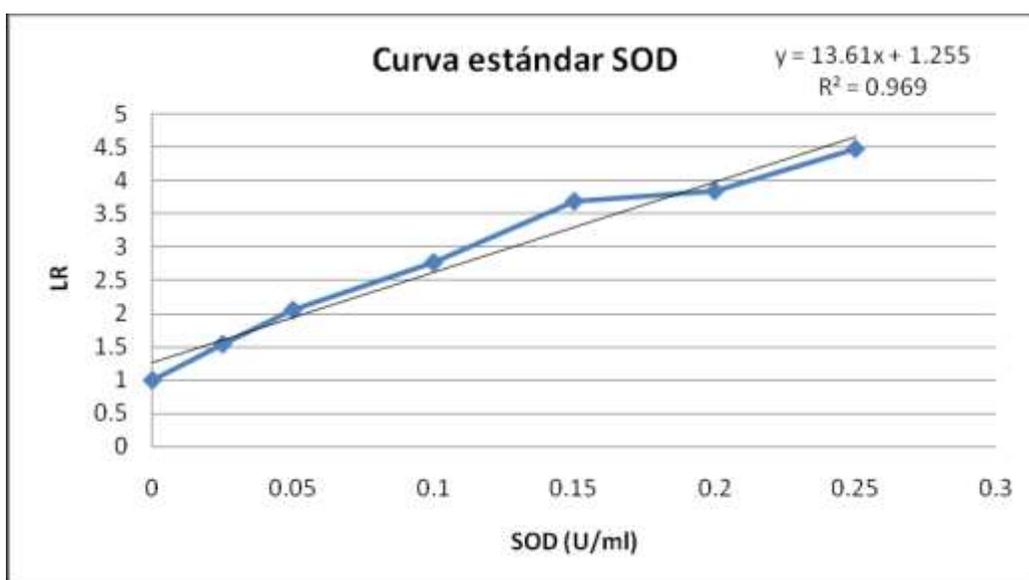
Tubo	SOD stock (µl)	Buffer de muestra (µl)	SOD U/ml
A	0	1,000	0
B	20	980	0.025
C	40	960	0.05
D	80	920	0.1
E	120	880	0.15
F	160	840	0.2
G	200	800	0.25

- **Curva Estándar**

Para calcular los resultados primero se determinó la absorbancia de cada muestra así como de los estándares. Se procedió a calcular el LR el cual se divide la absorbancia de la muestra o del estándar entre la absorbancia de la concentración cero (estándar A) ejemplo LR de la muestra X = $\text{abs X} / \text{abs std A}$. Se grafico la curva utilizando las concentraciones y el LR de los estándares.

Estándar [] SOD U/ml	Absorbancia	LR
------------------------------	--------------------	-----------

0	0.4065	1
0.025	0.264	1.5397
0.05	0.198	2.0530303
0.1	0.147	2.7653
0.15	0.1105	3.6787
0.2	0.106	3.8349
0.25	0.091	4.4670



Una vez realizada la curva y determinada la ecuación de la recta. Se definió la concentración de SOD (U/ml) con la siguiente formula.

$$\text{SOD (U/ml)} = [(\text{muestra LR- intercepto})/x] * (0.23\text{ml}/0.01\text{ml})$$

Observaciones

- Debe ser uno muy exacto con los tiempos de incubación debido a que el sustrato se degrada.
- Las muestras y estándares siempre se realizan por duplicado.
- Evitar la formación de burbujas.
- Al momento de colocar la tapa y mezclar, hay que evitar salpicar.

17. Glutación Peroxidasa (Gpx)

Fundamento

La glutación peroxidasa (Gpx) es una enzima que se encuentra en el citoplasma y mitocondria de todas las células. Los sustratos de esta enzima son el hidroperóxido lipídico, el colesterol hidroperóxido y el peróxido de hidrógeno. La Gpx posee una actividad antioxidante ya que reduce el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos en agua, glutación y alcohol (dependiendo del peróxido orgánico es el alcohol que se forma).

En el ensayo la formación de glutación formado por la acción de la glutación peroxidasa, esta acoplada al reciclamiento del glutación el cual utiliza NADPH y este a su vez es

convertido a la forma oxidada NADP⁺. Esta oxidación es monitoreada por medio de espectrofotometría a 340 nm y esto es indicativo de la actividad de glutatión.

Material

- Glutathione peroxidase assay kit #0805002.
- Celdas para espectrofotómetro UVette de la marca eppendorf #123005.
- Tubos falcón de 15 y 50 ml de la marca Corning.

Equipo

- Espectrofotómetro de celda DU 530, Marca BeckMan Coulter con filtro de 340 nm.

Soluciones

- **Solución de trabajo**

En un tubo falcón de 50 ml se colocaron 25 ml del Gpx-assay buffer y se vertió el contenido de un vial del reactivo Gpx 1, se lavó con el buffer para recuperar todo el contenido del vial. Se adicionaron 200 µl del reactivo Gpx 4 (el cual previamente se atempero a 25°C). Esta solución es solo estable por 10 horas y se almacenó a temperatura ambiente.

- **Solución de comienzo**

Se colocaron 2.14 ml del reactivo Gpx 3 a un vial del reactivo Gpx-2. Esta solución es solo estable por 10 horas y se almacenó a temperatura ambiente.

- **Material QC**

Se adicionaron 0.5 ml de agua miliQ al vial de material QC, el cual fue utilizado como control.

Cálculos

La actividad de Gpx se expresó en U/L. En el cual se calculo la Abs por minuto (Δ Abs/min) restando las dos absorbancias (la del tiempo cero y al minuto), una vez determinada la determina la Δ Abs/min se multiplica por el factor F

$$F = (TV/SV) \times 10^3/6.22$$

TV= volumen total en ml

SV= volumen de la muestra en ml

10^3 = convertir ml en litros

6.22 = coeficiente milimolar de absorbancia

18. Extracción de RNA total por Trizol

Fundamento

El trizol es una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina. El trizol mantiene la integridad del RNA (ya que el isotiocianato de guanidina es un inhibidor de RNAsas) mientras lisa las células y disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo seguido de la centrifugación separa la solución en una fase acuosa y una fase orgánica. Una vez que se transfiere la fase acuosa el RNA es recuperado por medio de la precipitación con Isopropanol.

Material

- Trizol
- Tupos eppendorf de 1.5 ml estériles.
- Cloroformo
- Isopropanol
- Agua con dietil pirocarbonato (DEPC)
- Etanol
- Glucógeno

Equipo

- Centrifuga refrigerada
- Campana de flujo laminar
- Vórtex

Protocolo

1. Se colocaron 400 μ l de suero en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se adicionaron 600 μ l de trizol frío, se mezcló completamente con vórtex a velocidad baja. La mezcla se incubó por 5 minutos en hielo.
2. Se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitó suavemente e incubó en hielo durante 5 minutos.
3. Se sometió a centrifugación la mezcla a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C. La fase acuosa superior se separa y transfiere en un tubo eppendorf estéril (sin contaminar con la fase orgánica).
4. Se adicionaron 600 μ l de Isopropanol y 10 μ l de glucógeno (20 μ g/ μ l) para precipitar el RNA y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó por una hora a -20°C ó a -70°C toda la noche.
5. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
6. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de RNA en 50 μ l en agua en DEPC.
7. Se repitió la precipitación del RNA utilizando 150 μ l de etanol al 100% y centrifugar las muestras a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

8. Se resuspendió el precipitado en 20 µl de agua DEPC y se almacenó a -70°C hasta la realización de la reacción de retrotranscripción.

Observaciones

- Es importante trabajar en condiciones estériles y con guantes debido a la degradación del RNA por la acción de las RNAsas.
- Siempre trabajar en hielo para evitar la activación de las RNAsas.
- El RNA extraído mediante esta técnica es estable durante 9 meses aproximadamente.
- Durante el paso de recuperación de la fase acuosa es muy importante no contaminar con la fase orgánica.

19. Extracción de RNA viral por columna

Fundamento

Para la extracción de RNA por columna se utilizó la tecnología de membrana de silica gel la cual permite un mayor rendimiento en la extracción, una alta pureza además de concentrar la muestra. La membrana de silica gel es específica para la unión con RNA y DNA mediante la presencia sales caotrópicas, las cuales remueven el agua de moléculas hidratadas en solución. Los polisacáridos y proteínas no son absorbidos por la membrana.

Se realiza un paso de lavado en donde se utiliza una solución baja en sales o sin sales que permite la elución del ácido nucleico y su total recuperación.

Material

- QIAamp UltraSens Virus Kit de la marca QIAGEN #53704
- Tubos eppendorf estériles de 2 ml
- Tubos eppendorf estériles de 1.5 ml
- Etanol (96-100%).

Equipo

- Centrifuga refrigerada
- Vórtex
- Thermomixer de la marca eppendorf

Protocolo

1. Se colocó 1 ml de plasma equilibrado a temperatura ambiente en un tubo eppendorf de 2 ml. Para las muestras que no se completó la cantidad de muestra; el volumen se ajustó con PBS 1X estéril. No se procesaron muestras de plasma con un volumen menor de 200 μ l.
2. Se colocaron 800 μ l del buffer AC y se colocó en la tapa del tubo 5.6 μ l del RNA carrier.
3. Se cerró la tapa y se mezcló por inversión 3 veces y en vórtex durante 10 segundos.
4. Se incubó la muestra a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 minutos. No se dejó incubar por más de 15 minutos.
5. La muestra fue centrifugada a 1200 g durante 3 minutos.
6. Se descartó el sobrenadante.
7. Se adicionó a cada muestra 300 μ l del buffer AR calentado a 60°C y 20 μ l de proteinasa K.
8. Se mezcló vigorosamente la muestra hasta disolver por completo la pastilla.
9. Se incubó por 10 minutos a 40°C a máxima velocidad en el termomixer.
10. Se le dió in spin a las muestras.
11. Se adicionaron 300 μ l del buffer AB, se mezcló vigorosamente por vortex, se centrifugó brevemente.

12. Se colocaron 700 μ l del lisado en la columna (la cual contenía un tubo colector de 2 ml). La muestra se centrifugó a 5000 g durante 1 minuto.
13. Se desechó el tubo colector anterior y se colocó uno nuevo. Cuidadosamente se colocó en la columna 500 μ l del buffer AW1. La muestra se centrifugó a 6000 g durante 1 minuto.
14. Se desechó el tubo colector anterior y se colocó uno nuevo. Se colocó en la columna 500 μ l del buffer AW2. La muestra se centrifugó a 20,000 g durante 3 minutos.
15. Se desechó el tubo colector anterior y se colocó la columna en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Se colocó cuidadosamente sin tocar la membrana 30 μ l del buffer AVE. Se centrifugó la muestra a 6000 g durante 1 minuto.
16. El proceso se repitió.
17. La muestra se almacenó hasta su uso a -70°C .

Soluciones

- **RNA carrier**

Se adicionaron 310 μ l del buffer AVE al tubo con el RNA carrier deshidratado. Obteniendo una solución con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. El RNA carrier se dividió en alícuotas de 30 μ l, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las alícuotas no se descongelaron más de tres veces.

- **Buffer AB**

Se adicionaron 15 ml de etanol, se mezcló por inversión durante 10 ocasiones. Una vez disuelto es estable por 7 meses, almacenado a temperatura ambiente.

- **Buffer AW1**

Se adicionaron 25 ml de etanol, se mezcló por inversión durante 10 ocasiones. Una vez reconstituido es estable por 1 año almacenado a temperatura ambiente.

- **Buffer AW2**

Se adicionaron 30 ml de etanol, se mezcló por inversión durante 10 ocasiones. Una vez reconstituido es estable por 1 año almacenado a temperatura ambiente.

Observaciones

- Es muy importante deshacer el coagulo de proteínas y lípidos (paso 6) ya que de lo contrario la muestra no pasara por la membrana de la columna y de esta manera no se llevara a cabo la extracción.
- En caso de tener problemas para deshacer el coagulo (una vez que se haya mezclado en vortex vigorosamente durante un tiempo considerable) se puede colocar un exceso de proteinasa K de 2-5 μ l.

20. Extracción de DNA por TSNT a partir de sangre periférica

Fundamento

El objetivo de aislamiento de DNA es el de obtener muestras útiles de DNA libres de algunos o de todas las moléculas contaminantes y de componentes celulares. Se realizará una extracción de células lisadas por la fuerte acción desnaturalizante de los detergentes SDS y tritón X-100. Los detergentes junto con las proteínas desnaturalizadas son extraídos con fenol saturado y cloroformo, al centrifugar se forma una placa sólida en

la interfase, entre la fase acuosa y la orgánica. Con cuidado, se recupera la fase acuosa, (que queda en la parte superior) y que contiene el DNA, el cual es precipitado por la adición de etanol. El DNA obtenido se lava con etanol 70%, se seca y se disuelve en una solución amortiguadora de Tris-EDTA. Para verificar la extracción se corre una alícuota con una electroforesis en gel de agarosa y se visualiza con bromuro de etidio y luz ultravioleta. El DNA obtenido puede utilizarse para realizar una digestión con enzimas de restricción o realizar una PCR.

Material

- Sangre anticoagulada con EDTA.
- Buffer de lisis TSNT.
- Fenol saturado con Tris-HCl pH 8.
- Sevag (Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1).
- Etanol 100% y 70%.
- Buffer TE 1x.
- Tubos eppendorf 1.5 mL.

Equipo

- Centrifuga para tubos eppendorf

Protocolo

1. En un tubo eppendorf colocar 500 ul de sangre anticoagulada con EDTA.
2. Agregar 200 uL de buffer de lisis TSNT y mezclar perfectamente por inversión 1 minuto.
3. Agregar 500 uL de fenol saturado. Mezclar perfectamente.

4. Agregar 100 ul de Sevag. Agitar vigorosamente hasta homogenizar completamente por espacio de 5 minutos. Este paso es muy importante para obtener buenos resultados en la extracción.
5. Añadir 150 ul de TE 1x pH 8 y mezclar perfectamente por 1 minuto.
6. Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm
7. Recuperar la fase acuosa que se encuentra en la parte superior utilizando una micropipeta de 200 ul transferir a otro tubo eppendorf de 2 ml.
8. El ADN se precipita agregando, muy lentamente por las paredes 2 volúmenes de etanol al 100% (aprox. 1 mL). Se mezcla lentamente por inversión hasta observar la precipitación del ADN en forma de una hebra blanca.
9. Adicionar 100 ul de acetato de sodio 0.3 M.
10. Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
11. Descartar el sobrenadante teniendo cuidado de que no se desprenda la pastilla de ADN.
12. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70% mezclar y centrifugar igual que en el paso anterior y decantar con cuidado el sobrenadante.
13. Secar la pastilla al aire. Adicionar 30 ul de TE 1x.

Soluciones

- **Buffer de lisis TSNT**

Para la preparación de este buffer se utilizaron las siguientes soluciones TRITÓN 2% 100X, SDS 1%, NaCl 100 mM Y TRIS-HCl 10 mM pH 8.

Para 100 ml de solución: se disolvieron 1.211 gr de Tris-Cl en 80 ml de agua destilada, se adicionaron 5.8 gr de NaCl y se mezcló, se agregó 1 gr de SDS y se mezcló, y finalmente se adicionaron 2 mL de tritón y se aforo a 100 ml con agua destilada.

- **TE 1x pH 8**

Para la preparación de este buffer se utilizaron las siguientes soluciones: Tris 0.01 M (1.211 g), EDTA 0.001 M (0.372 g), agua bidestilada (1000 ml). Para un litro de solución se disolvió el Tris en 600 mL de agua bidestilada, se adicionó EDTA y se mezcló perfectamente, el pH se ajustó a 8 con ácido clorhídrico y posteriormente la solución se aforo a un litro con agua bidestilada. Por último la solución se esterilizó en la autoclave.

21. RT-MMLV

Fundamento

En esta técnica la formación de cDNA es llevada a cabo por acción de la enzima denominada retrotranscriptasa reversa . En este caso se utiliza la enzima MMLV (mouse moloney murine leukemia virus), la cual es una DNA polimerasa que sintetiza DNA a partir

de una molécula sencilla de RNA, DNA o a partir de un híbrido RNA-DNA. Esta es una enzima recombinante purificada a partir de E.coli. Posee actividad 5'-3' ribonucleasa H, la cual permite la síntesis de cDNA de gran longitud (> 7 kb).

Material

- Buffer RT 5X
- Random primers 0.02 mg/ml
- DTT 0.01 M
- dNTP's 10 mM
- RNA inhibidor 40 U/ml
- Agua en DEPC
- Tubos eppendor 0.2 ml

Equipo

- Termociclador

Protocolo

1. En un tubo se colocó: 1 µl de random primers, 3 µl de RNA y 7.5 µl de agua DEPC.
2. Se colocaron los tubos en el termociclador por 72°C durante 10 minutos.
3. La muestra se incubó en hielo durante 3 minutos.
4. Se prosiguió a preparar la siguiente mezcla de reacción: 4 µl de buffer RT 5x, 2 µl DTT 0.1 M, 0.5 µl RNA's inhibitor, y 1 µl dNTP's 10 mM.
5. Se añadió 8 µl de la mezcla de reacción a cada uno de los tubos y así como 1 µl de la enzima M-MLV.
6. Los tubos fueron incubados 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 1 hora.
8. Finalmente se incubaron durante 5 minutos a 94°C. Se almacenaron a -20°C hasta su uso.

22. Curva estándar para HCV a partir de DNA plasmidico

Fundamento

El DNA genómico o plasmídico contienen secuencias blanco que son utilizadas como estándares para la PCR cuantitativa. El cálculo se realiza a partir de la masa del DNAg o del plásmido y su correspondiente en número de copias.

Material

- Plásmido pFK1 389/ NS3-3'/ wt (replicón).
- TE 1X estéril.
- Tubos eppendorf de 1.5 ml estériles.

Equipo

- Pipetas
- Vórtex
- Biofotómetro

Protocolo

Paso No 1

Se determinó la longitud en pares de bases del genoma de interés en este caso el tamaño del plásmido pFK1 389/ NS3-3'/ wt su tamaño es de 11,052 pb.

Paso No 2

Se determinó la masa del plásmido utilizando la siguiente fórmula:

$$m = (n)(1.096 \times 10^{-21} \text{ g/pb}) \quad m = (11,052 \text{ pb})(1.096 \times 10^{-21} \text{ g/pb}) = \mathbf{1.21 \times 10^{-17} \text{ g}}$$

m= masa, n= tamaño del plásmido (pb)

Paso No. 3

Una vez obtenida la masa se dividió por el número de copias del gen de interés (genoma VHC) por genoma haploide. En este caso es **1** ya que el plásmido solo posee una copia del genoma de VHC. Por lo tanto la masa por copia fue de **1.21x10⁻¹⁷ g/copia**.

Paso No. 4

Posteriormente, se determinó la masa del plásmido con base en cierto número de copias. En este caso el número de copias de interés fue de 10 a 20×10^6 . Para realizar esto se siguió la siguiente fórmula:

$$\# \text{ copias} \times \text{masa/copia} = \text{masa de DNA en gramos}$$

# Copias		Masa del DNA en gramos (g)
20,000,000	1.21×10^{-17} g/copia.	2.42×10^{-10}
10,000,000		1.21×10^{-10}
5,000,000		6.05×10^{-11}
1,000,000		1.21×10^{-11}
500,000		6.05×10^{-12}
100,000		1.21×10^{-12}
10,000		1.21×10^{-13}
1000		1.21×10^{-14}
100		1.21×10^{-15}
50		6.05×10^{-16}
10		1.21×10^{-16}

Paso No 5

Posteriormente, se calculó la concentración del plásmido necesario que contuviera el número de copias de interés. Para esto se dividió la masa (calculada en el paso 4) entre el volumen que se desea por reacción. Elegimos el volumen de 5 μ l (debido a que volúmenes pequeños son más propensos a error)

# Copias	Volumen de la muestra por rxn	Masa del DNA en gramos (g)	[] plásmido g/ µl
20,000,000	5 µl	2.42×10^{-10}	4.84×10^{-11}
10,000,000		1.21×10^{-10}	2.42×10^{-11}
5,000,000		6.05×10^{-11}	1.21×10^{-11}
1,000,000		1.21×10^{-11}	2.42×10^{-12}
500,000		6.05×10^{-12}	1.21×10^{-12}
100,000		1.21×10^{-12}	2.42×10^{-13}
10,000		1.21×10^{-13}	2.42×10^{-14}
1000		1.21×10^{-14}	2.42×10^{-15}
100		1.21×10^{-15}	2.42×10^{-16}
50		6.05×10^{-16}	1.21×10^{-16}
10		1.21×10^{-16}	2.42×10^{-17}

Paso No 6

Una vez realizados los cálculos, se procedió a preparar las diluciones seriadas del plásmido, utilizando la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

En donde C= concentración total de la reacción y V= volumen de reacción.

La concentración de nuestro stock se determinó por espectrofotometría la cual fue de 3860.4 ng/µl. A partir de nuestro stock se realizaron las siguientes soluciones de trabajo:

Soluciones de trabajo

- $X (3.864 \times 10^{-6} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2 \times 10^{-7} \text{ g/ } \mu\text{l}) (100 \text{ } \mu\text{l}) = 5.2 \text{ } \mu\text{l}$ del plásmido + 94.8 μl de TE 1X estéril.
- $X (2 \times 10^{-7} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l}) (100 \text{ } \mu\text{l}) = 10 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo $2 \times 10^{-7} \text{ g/ } \mu\text{l}$ + 990 μl de TE 1X estéril.
- $X (2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) (100 \text{ } \mu\text{l}) = 10 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo $2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l}$ + 990 μl de TE 1X estéril.
- $X (2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l}) (100 \text{ } \mu\text{l}) = 10 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo $2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}$ + 990 μl de TE 1X estéril.
- $X (2 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2 \times 10^{-15} \text{ g/ } \mu\text{l}) (100 \text{ } \mu\text{l}) = 10 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo $2 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l}$ + 990 μl de TE 1X estéril.

A partir de las soluciones de trabajo se prepararon las distintas diluciones de la curva estándar

Diluciones

- **20,000,000 copias/ μl**

$X (2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (4.84 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \text{ } \mu\text{l}) = 24.2 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo $2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l}$ + 975.8 μl de TE 1X estéril.

- **10,000,000 copias/ μl**

$X (2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2.42 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \text{ } \mu\text{l}) = 12.1 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo $2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l}$ + 987.9 μl de TE 1X estéril.

- **5,000,000 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (1.21 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \text{ } \mu\text{l}) = 6.05 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-9} \text{ g/ } \mu\text{l} + 993.95 \text{ } \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

- **1,000,000 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2.42 \times 10^{-12} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \text{ } \mu\text{l}) = 121 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l} + 879 \text{ } \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

- **500,000 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2.42 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \text{ } \mu\text{l}) = 60.5 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l} + 939.5 \text{ } \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

- **100,000 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2.42 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \text{ } \mu\text{l}) = 12.1 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l} + 987.9 \text{ } \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

- **10,000 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2.42 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \text{ } \mu\text{l}) = 12.1 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-11} \text{ g/ } \mu\text{l} + 987.79 \text{ } \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

- **1,000 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2.42 \times 10^{-15} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \text{ } \mu\text{l}) = 12.1 \text{ } \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l} + 987.79 \text{ } \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

- **100 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2.42 \times 10^{-16} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \mu\text{l}) = 1.21 \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-13} \text{ g/ } \mu\text{l} + 998.79 \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

- **50 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-15} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (1.21 \times 10^{-16} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \mu\text{l}) = 60.5 \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-15} \text{ g/ } \mu\text{l} + 939.5 \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

- **10 copias/ μ l**

$X (2 \times 10^{-15} \text{ g/ } \mu\text{l}) = (2.42 \times 10^{-17} \text{ g/ } \mu\text{l}) (1000 \mu\text{l}) = 12.1 \mu\text{l}$ de la solución de trabajo
 $2 \times 10^{-15} \text{ g/ } \mu\text{l} + 987.9 \mu\text{l}$ de TE 1X estéril.

Observaciones

- No se recomienda preparar estándares para la cuantificación absoluta a partir de RNA ya que no se tiene un control sobre la eficiencia de la transcripción reversa.
- Las diluciones de los estándares se almacenaron a -20°C debido a que se utilizaron de manera inmediata, en caso de almacenarlas por más tiempo se recomienda que sea a -70°C .
- Se recomienda realizar diluciones seriadas para evitar errores.

- El plásmido que se utilizó fue purificado por columna. Es importante utilizar DNA plasmidico o genómico puro, ya que si esta contaminado con RNA puede incrementar la Abs_{260} lo que ocasiona una determinación en el número de copias errónea.
- Es importante trabajar con extrema precaución para evitar problemas de contaminación.

23. Detección cualitativa para VHC

Fundamento

Para determinar la existencia de RNA viral en pacientes que presentaron una seropositividad para VHC, se les realizó la prueba de PCR cualitativa para VHC. La detección de RNA-VHC por medio de RT - PCR es un método directo y sensible, útil en el

diagnóstico de infecciones por VHC. La aplicación de este método es importante sobre todo para casos dudosos de infección por VHC en donde no se logran detectar anticuerpos anti-VHC, y en aquellos casos de hepatitis aguda en los que todavía no se generan anticuerpos anti-VHC. También es importante realizar el diagnóstico molecular para resolver problemas de sensibilidad y especificidad de los estudios inmunológicos (confirmar resultados), para hacer un diagnóstico directo de la infección (identificación del RNA viral) y para valorar el tratamiento con interferón de los pacientes infectados con este virus.

A nivel mundial la detección y cuantificación del RNA-VHC tiene una amplia aplicación en el estudio y manejo clínico de las infecciones por este virus.

Material

- Agua estéril
- Buffer TBE
- Taq Polimerasa
- Buffer de Taq 10X
- MgCl₂ 25 mM
- dNTP's 10 mM
- Primers Específicos (HCV1 HCV2, HCV 3 y HCV 4) 10 μM
- Agarosa
- Marcador de peso molecular

Equipo

- Microcentrífuga
- Campana de seguridad
- Termociclador
- Vórtex
- Cámaras de electroforesis horizontales
- Fuente de poder
- Vórtex
- Balanza Granataria

Oligos

Oligo	Secuencia	Posición de alineamiento	Producto amplificado
HCV 1	5'-CTGTGAGGAACTACTGTCTTC-3'	-297 a -278	221 pb
HCV 2	5'-CAACACTACTCGGCTAGCAGT-3'	-96 a -77	
HCV 3	5'-ACGCAGAAAGCGTCTAGCCAT-3'	-276 a -256	193 pb
HCV 4	5'-ACTCGGCTAGCAGTCTTGCGG-3'	-102 a -83	

Protocolo

1. Para la amplificación se utilizaron 5 µl del cDNA recién sintetizado (el cual fue previamente sintetizado por la reacción de retrotranscripción por MMLV (ver anexo 21) y se mezclaron con 45 µl de la mezcla de reacción de PCR la cual se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. µl
Agua Mili Q	-	-	27.5
Buffer 10X (500mM KCl 1000mM Tris-HCl,pH=8.3)	10 X	1X	5

MgCl ₂	25mM	2.5 mM	5
dNTPs Mezcla	10 mM c/u	100 µM	2
HCV-1	10 µM	0.5 µM	2.5
HCV-2	10 µM	0.5 µM	2.5
Taq ADN Polimerasa	5 U/µl	2.5 U	0.5
Vol. de la Mezcla de Reacción			45
DNAc			5
	Vol. TOTAL		50

2. Posteriormente los tubos se colocaron en el termociclador bajo el siguiente programa de PCR:

Tiempo	Temperatura °C
1 min	94
1 min	94
1 min	58
1 min	72
10 min	72

} 35 ciclos

3. Una vez terminada la PCR las muestras se sometieron a una segunda amplificación (PCR anidada).
4. Para la segunda amplificación se utilizó 1 µl del producto obtenido en el primer PCR y se mezclaron con 48 µl de la mezcla de reacción, la cual se realizó de la siguiente manera:

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. μ l
Agua Mili Q	-	-	33.5
Buffer 10X (500mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH=8.3)	10 X	1X	5
MgCl ₂	25mM	2.5 mM	3
dNTPs Mezcla	2.5 mM c/u	100 μ M	2
HCV-3	10 mM	0.5 μ M	2.5
HCV-4	10mM	0.5 μ M	2.5
Taq ADN Polimerasa	5 U/ μ l	2.5 U	0.5
Vol. Total			49
PA 1 ^{er} PCR			2
	Vol. TOTAL		50

5. Posteriormente se los tubos se colocaron en el termociclador bajo el siguiente programa de PCR:

Tiempo	Temperatura °C
5 min	94
1 min	94
1 min	58

} 35 ciclos

1 min	72
10 min	72

6. La detección de los productos de amplificación se realiza por análisis electroforético en geles de agarosa al 2% en buffer TBE (Tris HCl 1 M, ácido bórico 1M y EDTA 0.5mM) teñidos con bromuro de etidio.
7. Colocar 5 µl de cada muestras con 1 µl de Jugo Azul, además, se utilizan marcadores de pares de bases (ADN 50 Ladder, Gibco u otro marcador que incluya fragmentos de entre 100 y 400 pb) para estimar el tamaño del producto amplificado, se colocan 3 µl del marcador con 1 µl de Jugo azul en el primer y en el último carril, delimitando las muestras.
8. El gel se corrió primero a 80V para que entren las muestras y posteriormente a 110V durante 1 hora o el tiempo necesario para que al correr el colorante quede a las ¾ partes del gel. Después de la corrida se teñió el gel con bromuro de etidio (2 mg/ml) durante 5 min, enjuagarlo y con agua corriente y se visualizó en el Fotodocumentador a través del software Molecular Analyst.

Observaciones

- La PCR anidada es muy propensa a contaminación es por eso de suma importancia utilizar puntillas con filtro y colocar el producto amplificado fuera de la campana.
- Un resultado positivo es confirmatorio para el diagnóstico de VHC.

24. Carta de consentimiento informado



Estudio Clínico Exploratorio para evaluar el efecto de Antiinflamatorios no Esteroides (AINEs) en la carga viral de pacientes con hepatitis C



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

El virus de la hepatitis C (VHC) es de gran interés médico, debido a que la infección con este virus es una de las principales causas de hepatitis crónica, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC) en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más del 3% (~200 millones) de la población mundial esta infectada con este virus. Desafortunadamente, solo un 40% de los pacientes responden al tratamiento estándar (interferón pegilado y ribavirina), por lo que surge la necesidad de buscar nuevas opciones terapéuticas.

Procedimiento del estudio

Durante la visita se le tomará una muestra de sangre periférica (3-5 ml) a los tiempos señalados de: 0, 1, 2, 3, 7 y 14 días antes del tratamiento y durante el tratamiento asignado. Con la finalidad de realizar estudios enfocados a la identificación del virus de la hepatitis C y conocer la cantidad presente del virus.

Riesgos asociados al estudio

Los riesgos en la toma de muestra son muy raros y no ponen en peligro la vida del paciente. El mayor riesgo podría ser un moretón en el brazo.

Beneficios que aporta este estudio al paciente

- ❖ Realización de pruebas diagnósticas para el virus de la hepatitis C de manera gratuita.
- ❖ Derecho a solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación. Además, se tiene la libertad de retirarse en el momento que se desee y esta decisión no afectará en futuros tratamientos.
- ❖ La información obtenida en este proyecto será manejada en forma confidencial y en ningún momento se violará la privacidad.

Responsable de la investigación

Dra. Ana María Rivas Estilla

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, NL

Teléfono: 83294174 extensión: 2590, 2824

Fecha: _____

PACIENTE O FAMILIAR DIRECTO

Nombre: _____

Dirección: _____

Firma

TESTIGO

Nombre: _____

Dirección: _____

Firma

TESTIGO

Nombre: _____

Dirección: _____

Firma

RESPONSABLE

Nombre: _____

Firma

25. Cuestionario de efecto adversos



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO
UNIDAD DE HIGADO Y DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
AV. GONZALITOS NO. 235 NTE. COL. MITRAS CENTRO, MONTERREY, N. L. CP 64460
TEL DIRECTO 83-29-42-05 FAX 83-47-61-80 CONM. 83-29-40-50 EXT. 2770-2774



NOMBRE _____ No. REGISTRO _____

EDAD _____ SEXO _____ GENOTIPO _____

FECHA DE INICIO DE TRATAMIENTO

BIOPSIA HEPÁTICA

CARGA VIRAL

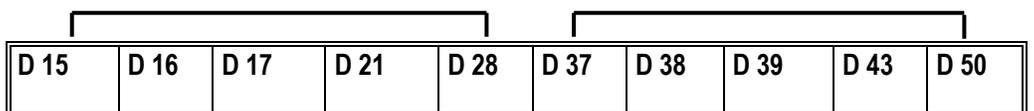
Basal	3 meses	6 meses	12 meses

	FASE 2					FASE 4				
	D 15	D 16	D 17	D 21	D 28	D 37	D 38	D 39	D 43	D 50
FECHA										

SÍNTOMAS GRIPALES										
Astenia										
Fiebre										
Escalofríos										
Cefalea										
Mialgias										
Artralgias										
Tos										
Dolor de espalda										
Anorexia										
Vértigo										

FASE 2

FASE 4



GASTROINTESTINALES										
---------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Náusea										
Vómito										
Dolor abdominal										
Diarrea										
Ictericia										
Coluria										
Acolia										
DERMATOLÓGICOS										
Alopecia										
Prurito										
Rash										
NEUROLÓGICOS Y/O PSIQUIATRICOS										

Dism. de atención										
Dif. en concentrarse										
Ansiedad										
Irritabilidad										
Depresión										
Ideas Suicidas / Paranoides										
Dificultad para dormir										

FASE 2

FASE 4

D 15	D 16	D 17	D 21	D 28	D 37	D 38	D 39	D 43	D 50
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

HEMATOLÓGICOS										

Anemia										
Leucopenia / PMN										
Trombocitopenia										
INMUNOLÓGICOS										
Inf. Bacterianas										
Rx autoinmunes										
Pérdida de peso										