



## El etanol aumenta la replicación y expresión génica del VHC

**K. C. TRUJILLO MURILLO \*, H. G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ \*, H. A. BARRERA SALDAÑA\*,  
J. RAMOS JIMÉNEZ\*\*, A. M. RIVAS ESTILLA\***



La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una enfermedad de gran importancia médica a nivel mundial debido a tres razones principales. Primero, por el significativo número de personas infectadas (~170 millones de individuos en el mundo);<sup>1</sup> segundo, la hepatitis crónica por el VHC puede progresar a cirrosis, con el desarrollo posterior de carcinoma hepatocelular (CHC);<sup>2</sup> tercero, la única terapia disponible actualmente es el tratamiento combinado de interferón alfa pegilado (INF-PEG) y ribavirina.<sup>3</sup>

El genoma del VHC consiste en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva (cadena codificante) con una longitud de aproximadamente 9,600 nucleótidos,<sup>4,5</sup> y está flanqueado por las regiones 5' y 3' no traducibles (UTRs) de 341 y 230 nucleótidos de longitud, respectivamente. Estas dos regiones contienen secuencias nucleotídicas altamente conservadas y son esenciales en la síntesis de las proteínas y en la replicación viral.<sup>6,7</sup> Este RNA tie-

ne un solo ORF (marco de lectura abierto) que codifica para una poliproteína viral de aproximadamente 3,010-3,033 aminoácidos, que es procesada por proteasas celulares y virales para generar diez proteínas maduras. Las proteínas estructurales (core, E1 y E2), separadas de las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) por un péptido pequeño (p7), participan en el ensamblaje de las partículas virales de la nueva progenie, mientras que las proteínas NS son responsables de la replicación del genoma viral.<sup>5</sup>

Recientemente, el consumo de alcohol ha llamado mucho la atención, particularmente en los pacientes infectados con VHC, debido a la alta incidencia de infecciones por este virus en los consumidores de alcohol (>50 gr/día), en ausencia de otros factores conocidos como de riesgo. Por lo que se ha sugerido que el alcohol aumenta la capacidad del virus para persistir en la célula huésped.<sup>8</sup> De acuerdo con un estudio multicéntrico realizado en 1,456 pacientes, en México, entre las principales causas de cirrosis hepática se encuentran el consumo de alcohol y la infección por VHC.<sup>9</sup> Además, el etanol disminuye el efecto antiviral del INF- $\alpha$  pegilado vía estrés oxidativo,<sup>10</sup> y aumenta el índice

□ El presente artículo está basado en la investigación "El etanol aumenta la replicación y expresión génica del virus de la hepatitis C (VHC)", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2007 en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2007.

\*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL.

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

de CHC en pacientes con hepatitis C crónica;<sup>11</sup> sin embargo, aún se desconocen los mecanismos a través de los cuales el alcohol favorece la replicación del VHC y acentúa el daño hepático. Por otra parte, la expresión de la enzima ciclooxigenasa (COX-2) se ha asociado con CHC en pacientes VHC positivos. Además, estudios previos proponen que la expresión aumentada de COX-2 y de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>; metabolitos de la actividad enzimática de la COX-2) modulan la replicación de algunos virus como: citomegalovirus, gammaherpesvirus y el VHB.<sup>12</sup> Lo que ha despertado el interés por estudiar si la COX-2 participa en los procesos de regulación positiva o negativa de la replicación del VHC, vía estrés oxidativo. Con base en lo anterior, es de suma importancia conocer los mecanismos que modulan la replicación e inhibición del VHC.

## Objetivo

Evaluar el efecto del alcohol en la replicación y expresión génica del VHC, así como el papel de la enzima COX-2 en el modelo de replicones subgenómicos del VHC.

## Material y métodos

### Cultivo celular y tratamiento con etanol

Se utilizó la línea celular de hepatoma humano Huh7 replicón genotipo 1b, que expresa establemente las proteínas no estructurales del VHC<sup>13</sup> y la línea celular parental (sin replicón). Las células fueron expuestas a etanol (100, 150 y 200 mM) e incubadas durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se realizaron ensayos de viabilidad celular (reducción de azul alamar), se cuantificaron los niveles de las enzimas hepáticas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) como indicadores de daño hepático, y se midieron los niveles intracelulares de PGE<sub>2</sub>.

Asimismo, se realizó la cuantificación relativa del RNA viral por RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real y la identificación de las proteínas virales (NS5A y NPT-II) y celulares (actina y COX-2) por western blot.

### Constructos genómicos

El plásmido, que contiene el promotor de COX-2-P2-1900-Luc (-1796, +104) con dos sitios de unión para el factor de transcripción NF-κB, fue generosamente donado por el Dr. Miguel A. Iñiguez, del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", de Madrid, España.<sup>14</sup> El plásmido que expresa al replicón del VHC (pFKI<sub>389</sub>-NS3-3') y el plásmido que expresa a NS5A fueron donados por el Dr. Koromilas, del Lady Davies Institute, McGill University, Canadá.<sup>15</sup>

### Ensayos de transfección transitoria

Un día antes de la transfección 2 x 10<sup>5</sup> células Huh7 parental se sembraron en cada pozo de una placa de seis pozos. Al siguiente día, las células fueron infectadas con el virus vaccinia recombinante (que expresa a la T7 RNA polimerasa) durante una hora,<sup>16</sup> seguido de la transfección con el plásmido que expresa el gen de interés bajo el control del promotor de la T7. Las células fueron incubadas en medio sin suero a 37°C por 6 horas, seguido de la adición de medio con suero e incubadas por un tiempo de 48 horas. Finalmente, las células fueron cosechadas para extraer las proteínas totales.

### Cuantificación relativa de la actividad de luciferasa

Las células transfectadas (1 x 10<sup>4</sup> células) fueron lisadas de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial Promega (Madison, WI, USA), y se hizo la cuantificación relativa de la actividad de luciferasa en un luminómetro de la marca Turner Biosystems. En todos los experimentos de transfección se incluyó la cuantificación de luciferasa de Renilla, que sirvió para normalizar los ensayos de transfección.<sup>17</sup>

### Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo a partir de las células Huh7 VHC replicón, y se utilizó el reactivo Trizol de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El RNA fue precipitado y lavado una sola vez con etanol a

70%, y resuspendido en 30 ml de agua libre de RNasa.

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

El RNA total extraído fue sujeto a retrotranscripción (RT), utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Del cDNA obtenido en la etapa anterior se utilizaron 200 ng como templado para la PCR cuantitativa en tiempo real y se empleó el termociclador ABI Prism 7000 de la marca Applied Biosystems. Para la PCR se diseñó un par de iniciadores sobre la región 5'UTR del VHC. La secuencia de los iniciadores y de la sonda se detallan a continuación: 5'-GCGTCTAGGCCATGGCGTTA-3' (primer 1), 5'-GGTATCACCAGACGCCTTGG-3' (primer 2), y de la sonda 5'-FAM-CATACTCACAGCACGTC-DABCYL-3'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una etapa inicial a 50°C por 2 minutos, luego a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, y a 60°C por 60 segundos. Cada reacción de PCR incluyó 12.5 µl de Taqman Universal PCR Master Mix, 1.25 µl del ensayo 20X y 11.25 µl del cDNA diluido en agua DEPC (dietil pirocarbonato). Para normalizar la cuantificación relativa de los niveles del RNA viral se amplificó bajo las mismas condiciones el gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH: Applied Biosystems, ensayo 20X No. 4326317E).

### Extracción de proteínas totales y western blot

Las proteínas se extrajeron como se describe previamente.<sup>15</sup> Cuarenta microgramos de proteína total fueron separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y transferidas a una membrana PVDF (Polyvinylidene fluoride; Amersham Biosciences). La membrana fue incubada con los siguientes anticuerpos primarios; anticuerpos monoclonales: anti-VHC NS5A (dilución 1:1000; Biotools International), anti-actina (dilución 1:1000; MP Biomedicals), anti-COX-2 (dilución 1:500; Cayman), anti-luciferasa (dilución 1:1000; Serotec), y el anticuerpo policlonal: anti-

NPT-II (dilución 1:1000; Cortex Biochem), a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron: anti-ratón y anti-conejo (dilución 1:1000; Promega) conjugado con peroxidasa de rábano. Después de incubar la membrana con el anticuerpo secundario por 2 horas a 4°C, la reacción fue visualizada con un kit de Quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotechnology), de acuerdo con las especificaciones de la compañía.

### Cuantificación de PGE<sub>2</sub> intracelular

Para cuantificar los niveles intracelulares de PGE<sub>2</sub> se utilizó un kit de ELISA de la marca Amersham Biosciences (Freiburg, Germany).

### Análisis estadístico

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

## Resultados

### El etanol aumenta los niveles del RNA viral en las células Huh7 VHC replicón

Las células Huh7 VHC replicón fueron expuestas a concentraciones crecientes de etanol (100-200 mM) durante 72 horas, como control negativo se utilizaron células replicón sin tratamiento. Al finalizar el tiempo de incubación se hizo la extracción del RNA total, que fue sujeto a RT-PCR cuantitativa en tiempo real para medir los niveles del RNA viral. El tratamiento con etanol aumentó varias veces los niveles del RNA viral de una manera dosis dependiente comparado con las células sin tratamiento (figura 1A). Para los experimentos posteriores se decidió utilizar una concentración alta de etanol (150 mM; 6.9 g) debido a dos razones: la primera de ellas debido a que esta concentración mostró

94% de viabilidad celular (datos no mostrados) a las 72 horas de postratamiento; la segunda, para emular lo que sucede en un individuo cuando su ingesta de alcohol es crónica (150-200 mM).<sup>18-20</sup> Asimismo, se observó que la concentración de 150 mM de etanol no provocó daño citopático en ambas líneas celulares (parental y replicón) (figura 1B y 1C). Para determinar si el efecto positivo del etanol en los niveles del RNA viral era dependiente del tiempo de exposición las células Huh7 VHC replicón fueron tratadas con etanol (150 mM) durante 24, 48 y 72 horas. Se observó que el efecto del etanol dependió del tiempo de exposición, y fue más evidente a las 72 horas de postratamiento (4.36 veces más comparado con las células Huh7 VHC replicón sin tratamiento) (figura 1D).

### El etanol induce la expresión de las proteínas virales

Se evaluó si el etanol también aumentaba la expresión de las proteínas no estructurales del VHC, por lo que se detectó la proteína viral NS5A. Se obser-

vó que el etanol aumentó hasta 4.0 veces los niveles de la proteína viral NS5A comparado con las células Huh7 replicón sin tratamiento, y este efecto dependió del tiempo de exposición (figura 2, línea 6). Estos resultados sugieren que el etanol no sólo tuvo un efecto positivo en los niveles del RNA viral, también en los niveles de la proteína no estructural NS5A, expresada en el sistema de replicones subgenómicos del VHC.

### Etanol aumenta los niveles y la actividad enzimática de COX-2

Un posible mecanismo a través del cual el etanol aumenta la progresión del daño hepático es el estrés oxidativo. Algunos estudios han asociado al VHC con la inducción de la expresión de COX-2 vía estrés oxidativo.<sup>12,21</sup> Para investigar el posible mecanismo responsable de la regulación positiva del etanol se detectaron los niveles y actividad de la proteína COX-2. Se observó que los niveles de COX-2 fueron inducidos las células que expresan las proteí-

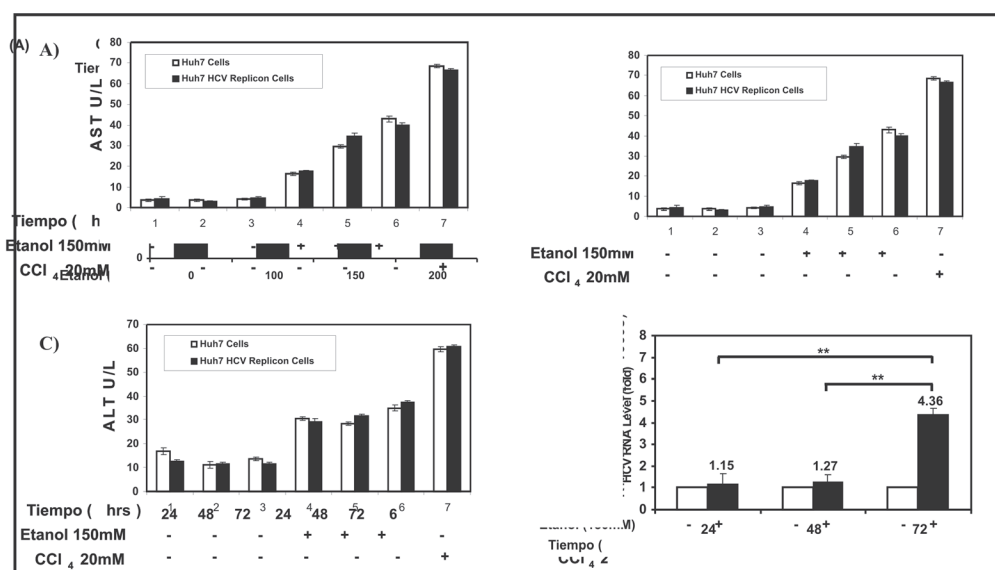


Fig. 1. Efecto del etanol en los niveles del RNA viral. A)  $2 \times 10^5$  células Huh7 VHC replicón sembradas en placas de seis pozos fueron tratadas con etanol (100, 150 y 200 mM) o sin etanol durante 72 horas. Postratamiento: los niveles del RNA viral fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real, utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems). B y C)  $2 \times 10^5$  células sembradas en una placa de seis pozos fueron tratadas en presencia o ausencia de etanol (150 mM) durante 24, 48 y 72 horas. Como control positivo de daño hepático, ambos tipos celulares fueron tratadas con 20 mM de  $\text{CCl}_4$  por 6 horas. Posteriormente, los niveles enzimáticos de AST y ALT fueron cuantificados en el medio de cultivo. D)  $2 \times 10^5$  células sembradas en placas de seis pozos fueron tratadas con etanol (150 mM) o sin etanol durante 24, 48 y 72 horas. Los niveles del RNA del VHC fueron normalizados con base en 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 éstos se incluyeron tres replicas (\*\* $P < 0.01$ ).

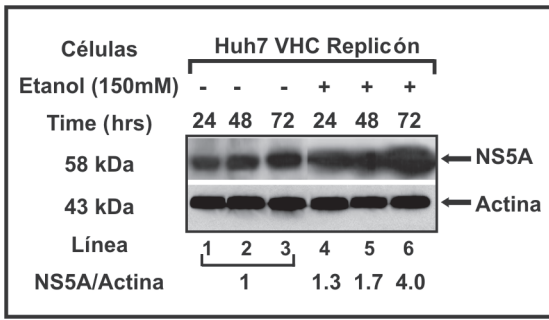


Fig. 2. Efecto del etanol en los niveles de la proteína viral NS5A. 5 x 10<sup>5</sup> células Huh7 VHC replicón sembradas en placas de 35 x 10 mm fueron incubadas en presencia (líneas 4-6) o ausencia (líneas 1-3) de 150 mM de etanol durante 24, 48 y 72 horas. Cuarenta microgramos de proteína total fueron utilizados en el western blot para detectar los niveles de la proteína NS5A (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas NS5A/actina fue semicuantificada con el programa Phoretix\1D versión 2003.02.

nas no estructurales del VHC (Huh7 VHC Replicón) (figura 3, líneas 7-9), mientras que los niveles de COX-2 fueron indetectables en las células Huh7 parental (sin replicón) (figura 3, líneas 1-3), hallazgo reportado previamente por Waris y Siddiqui.<sup>12</sup> Se observó que el etanol (150 mM) aumentó hasta tres veces los niveles de la proteína COX-2 en las células Huh7 VHC replicón (figura 3, líneas 10-12), pero no en las células parentales (sin replicón) (figura 3, líneas 4-6), sugiriendo que este efecto sólo fue potenciado en presencia de las proteínas virales.

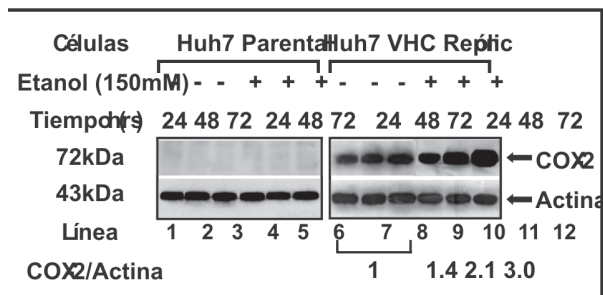


Fig. 3. Efecto del etanol en los niveles de la proteína COX-2. 5 x 10<sup>5</sup> células Huh7 Parental y Huh7 VHC replicón sembradas en placas de 35 x 10 mm fueron incubadas en presencia o ausencia de etanol (150 mM) durante 24, 48 y 72 horas. Cuarenta microgramos de proteína total se utilizaron en el western blot para detectar los niveles de las proteínas COX-2 (panel superior) y actina (panel inferior). La relación de las proteínas COX-2/actina fue semicuantificada con el programa Phoretix\1D versión 2003.02.

Asimismo, se observó que en las células Huh7 VHC replicón los niveles intracelulares de PGE<sub>2</sub> fueron mayores (figura 4, líneas 3, 7 y 11) que los obtenidos en las células Huh7 parentales (figura 4, líneas 1, 5 y 9), y en presencia de etanol los niveles de PGE<sub>2</sub> fueron significativamente mayores en las células Huh7 replicón (figura 4, líneas 4, 8 y 12) que en las células parentales (sin replicón) que también fueron tratadas con etanol (figura 4, líneas 2, 6 y 10).

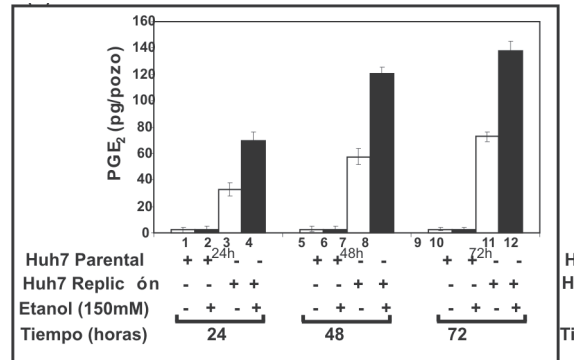


Fig. 4. Efecto del etanol en la actividad enzimática de COX-2. 1 x 10<sup>4</sup> células Huh7 parental y Huh7 VHC replicón sembradas en pozos de una placa de 96 pozos fueron tratadas en presencia o ausencia de etanol (150 mM) durante 24, 48 y 72 horas. Postratamiento: se cuantificaron los niveles intracelulares de PGE<sub>2</sub> con un kit de ELISA de la marca Amersham Biosciences. Los valores representan el promedio ± DS de tres experimentos y en cada uno de ellos se incluyeron tres replicas.

Para confirmar si la expresión de todas las proteínas no estructurales del VHC (NS2-NS5B) o una de éstas (NS5A) inducen la expresión de COX-2, se utilizó el plásmido COX-2-P2-1900-Luc. Las células Huh7 Parental se infectaron con el virus vaccinia recombinante por una hora,<sup>16</sup> seguido de la transfección transitoria con el plásmido COX-2-P2-1900-Luc (0.05µg) y cotransfección con concentraciones crecientes (0.01-1 µg) del plásmido que expresa al replicón completo del VHC pFKI<sub>389</sub>-NS3-3' o del plásmido que expresa a NS5A; 48 horas postransfección las células fueron lisadas y se hizo la cuantificación relativa de la actividad de luciferasa. Los resultados muestran que la expresión de las proteínas no estructurales del VHC (NS2-NS5B) median la activación del promotor de COX-2 de manera dosis-dependiente, tal como lo demuestra la cuantificación de la actividad de luciferasa/renilla

(figura 5). Además, NS5A aumentó hasta 4.7 veces la actividad del promotor de COX-2 comparado con las células que no fueron transfectadas con el plásmido que expresa a NS5A (figura 6).

### El AAS bloquea el efecto positivo del etanol en la replicación del VHC

Para evaluar el papel de COX-2 en la regulación positiva inducida por el etanol se utilizó el ácido acetilsalicílico (AAS), un antiinflamatorio no esteroideo (AINEs) que inhibe la actividad de COX (COX-1/COX-2). Las células Huh7 VHC replicón fueron tratadas con 4 mM de AAS 30 minutos antes de ser expuestas a etanol (150 mM) y se incubaron por 24, 48 y 72 horas. Al finalizar cada tiempo de incubación, se extrajo el RNA total y fue sujeto a RT-PCR cuantitativa en tiempo real para amplificar la región conservada 5'UTR del VHC y GAPDH. Se observó que el etanol aumentó y el AAS disminuyó los niveles del RNA del VHC, además en las células Huh7 VHC replicón que fueron tratadas con AAS y etanol, la presencia de la aspirina contrarrestó el efecto positivo del etanol en los niveles del RNA viral (figura 7, línea 12).

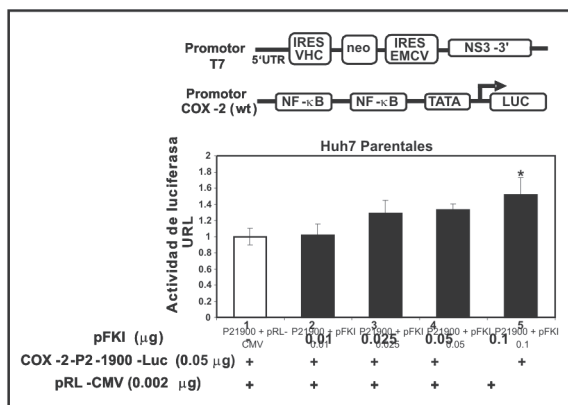


Fig. 5. Las proteínas NE del VHC modulan la actividad transcripcional de COX-2.  $1 \times 10^4$  células Huh7 parental sembradas en pozos de una placa de 96 pozos fueron infectadas, transfectadas con el plásmido COX-2-P2-1900-Luc y cotransfectadas con concentraciones crecientes (0.01-1 µg) del plásmido pFKI<sub>389</sub>-NS3-3'. Los valores representan el promedio  $\pm$  DS de tres experimentos y en cada uno de éstos se incluyeron tres réplicas (\* $P < 0.05$ ). Los resultados se expresan como unidades relativas de luciferasa (URL), respecto al control (sin el plásmido problema) que se define como 1.0.

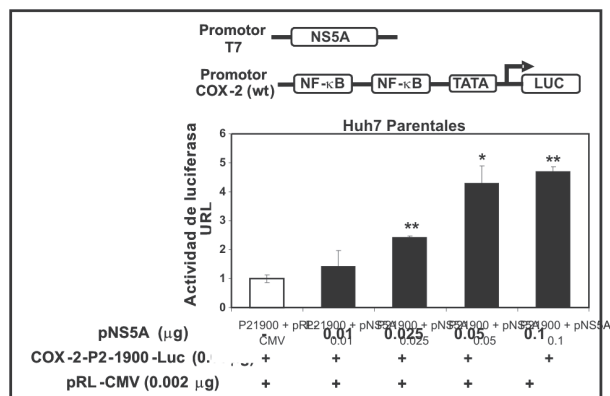


Fig. 6. La proteína viral NS5A modula la actividad transcripcional de COX-2.  $1 \times 10^4$  células Huh7 parental fueron infectadas, transfectadas con el plásmido COX-2-P2-1900-Luc y cotransfectadas con concentraciones crecientes (0.01-1 µg) del plásmido pNS5A. Los valores representan el promedio  $\pm$  DS de tres experimentos y en cada uno de éstos se incluyeron tres réplicas (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). Los resultados son expresados como unidades relativas de luciferasa (URL) con respecto al control (sin el plásmido problema) que se define como 1.0.

## Discusión

Actualmente la hepatitis C constituye una enfermedad infecciosa emergente de gran importancia médica a nivel mundial.<sup>22</sup> Además, la infección por el VHC se ha convertido en una causa importante de trasplante hepático.<sup>8</sup> Diversos factores parecen influir en la progresión rápida de la hepatitis C, entre éstos se encuentra la ingesta de alcohol (> 50 g/día) y la infección por el VHC, que representan las principales causas de cirrosis hepática en nuestro país.<sup>9</sup> Esta última representa la quinta causa de muerte en la población mexicana, de acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). Recientemente, el consumo de alcohol ha llamado mucho la atención, particularmente en los pacientes infectados con VHC, debido a la alta incidencia de infecciones por este virus en los sujetos consumidores de alcohol, en ausencia de otros factores conocidos como de riesgo. Por lo que se ha sugerido que el alcohol aumenta la capacidad del virus para persistir en la célula huésped.<sup>8</sup> Asimismo, varios estudios *in vivo* han demostrado una correlación directa entre la presencia del virus en sangre con la ingesta de alcohol. También en estos pacientes se ha sugerido que el daño hepático evoluciona mucho más rápido, com-

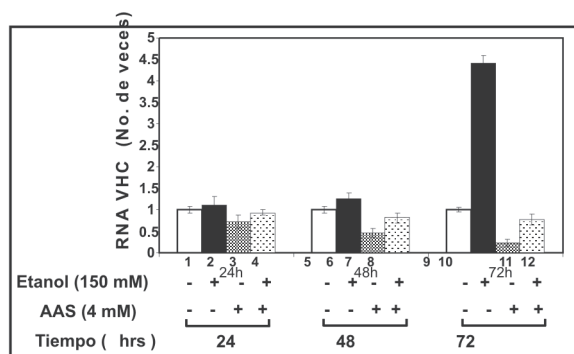


Fig. 7. El AAS bloquea el efecto positivo del etanol en las células Huh7 VHC replicón.  $2 \times 10^5$  células sembradas en placas de seis pozos fueron tratadas con AAS (4 mM) 30 minutos antes de ser incubadas en presencia o ausencia de etanol (150 mM), luego las células se incubaron durante 24, 48 y 72 horas. Postratamiento: los niveles del RNA viral se cuantificaron 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 se expresan como niveles del RNA del VHC (número de veces), 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 éstos se incluyeron tres réplicas (\*\* $P < 0.01$ ).

parado con los pacientes infectados que no consumen etanol.<sup>23,24</sup> Se sabe además que el etanol disminuye la respuesta a INF- $\alpha$  y aumenta el índice de CHC en pacientes con hepatitis C crónica.<sup>11</sup> Lo que sugiere que el etanol juega un papel importante como cofactor en la progresión del daño hepático; sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares a través de los cuales el alcohol favorece la replicación del VHC y acentúa el daño hepático.

Con base a lo anterior, es de suma importancia conocer los mecanismos moleculares que modulan la replicación e inhibición del VHC. Para tal propósito se utilizó el sistema de replicones subgenómicos del VHC.<sup>13</sup> Este sistema sólo expresa las proteínas no estructurales del VHC; sin embargo, hasta la fecha representa una alternativa importante a nivel mundial para identificar factores que regulan los mecanismos de replicación e inhibición del VHC, así como en el desarrollo de nuevas expectativas para la profilaxis y el tratamiento de la hepatitis C. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto del alcohol en la replicación y expresión génica del VHC empleando el modelo de replicones

subgenómicos, así como el papel de la proteína celular COX-2 en la regulación de los mecanismos de replicación e inhibición del VHC.

Los resultados en este trabajo demuestran que el tratamiento con 150 mM de etanol (6.9 g) reguló positivamente la expresión del replicón subgenómico del VHC, debido a que aumentó hasta 4.36 veces los niveles del RNA viral (figura 1D) y cuatro veces los niveles de la proteína viral NS5A (figura 2). Ambos efectos dependieron del tiempo de exposición siendo más evidente a las 72 horas de postratamiento. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente por Zhan *et al.*,<sup>11</sup> en los que el etanol (100 mM) aumentó hasta cuatro veces (comparado con las células sin tratamiento) la replicación viral en la línea celular Huh.8, que expresa establemente el replicón subgenómico del VHC. Sin embargo, los resultados obtenidos difieren de los reportados por Plumlee *et al.*,<sup>24</sup> debido a que ellos encontraron que el etanol (25-100 mM) disminuyó la replicación del VHC en el sistema de replicones. Algunas explicaciones para aclarar estas discrepancias son las siguientes: primero, en esta investigación el sistema de replicones fue diferente al utilizado por estos investigadores. Ellos emplearon células BB7 que son derivadas de las células de hepatoma humano Huh7 y que expresan establemente un replicón subgenómico del VHC, que contiene la mutación adaptativa S22041 en el gen NS5A. Segundo, Plumlee *et al.* hicieron una sola aplicación de la concentración de etanol (25-100 mM) en un periodo de 72 horas, mientras que en este caso, para evitar problemas de evaporación cada 24 horas, se reemplazó el medio que contenía el etanol a la concentración de 150 mM, este proceso se siguió hasta las 72 horas que duró el experimento.

Se observó que el etanol (150 mM) aumentó los niveles de COX-2 en las células Huh7 VHC replicón (figura 3, líneas 10-12); sin embargo, no tuvo un efecto significativo en las células parentales que también fueron tratadas con etanol (figura 3, líneas 4-6), sugiriendo que este efecto sólo fue potenciado en presencia de las proteínas virales. Además, el tratamiento con etanol aumentó la actividad enzimática de COX-2 (figura 4).

Adicionalmente se confirmó el hallazgo reportado antes por Waris y Siddiqui,<sup>12</sup> que hace referencia

que la expresión de las proteínas no estructurales del VHC median la actividad transcripcional (figuras 5 y 6) y los niveles de la proteína COX-2 (figura 3, líneas 7-9) comparado con las células Huh7 Parental (sin replicón) donde los niveles de COX-2 fueron indetectables (figura 3, líneas 1-3). Además, se observó que la inducción de la actividad transcripcional de COX-2, parece ser por un mecanismo dependiente de la unión del factor transcripcional NF- $\kappa$ B (Fig. 5 y 6). Sorpresivamente, el efecto positivo del etanol fue bloqueado por el AAS (figura 7).

## Conclusión

El tratamiento con etanol aumentó los niveles del RNA (hasta 4.36 veces) y de las proteínas (4.0 veces) del VHC. Este incremento fue bloqueado por el AAS, lo que sugiere la participación de la COX-2 en este mecanismo de regulación viral. Además, el etanol no sólo aumentó los niveles de la proteína celular COX-2, sino su actividad enzimática. Con base en lo anterior, el etanol y el VHC parecen coincidir en un mecanismo que a su vez induce la expresión de COX-2, enzima probablemente involucrada en la replicación del VHC. Basándonos en los resultados conseguidos, se sugiere el siguiente modelo hipotético (figura 8).

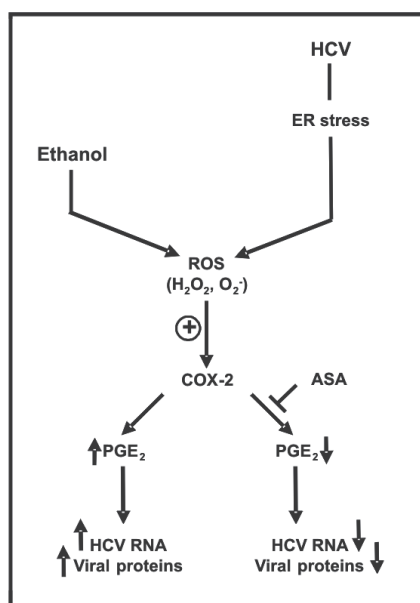


Fig. 8. Modelo propuesto de interacción virus-célula infectada.

## Resumen

El etanol acelera la progresión del daño hepático en los pacientes con hepatitis C crónica. Se utilizó el sistema de replicones subgenómicos del VHC para evaluar el efecto del etanol en la replicación y expresión génica del VHC. Se observó que el etanol aumentó los niveles del RNA y de las proteínas virales. Se observó que el etanol aumentó la expresión y actividad de la proteína COX-2 en las células Huh7 replicón, mientras que el AAS bloqueó dicho efecto. Lo que sugiere que, probablemente, la COX-2 modula el efecto del etanol en la replicación del VHC.

**Palabras clave:** Etanol, Ácido acetilsalicílico, Virus de la hepatitis C, Ciclooxygenasa-2.

## Abstract

It is known that alcohol consumption accelerates liver damage in patients with chronic HCV infection. We used the hepatitis C virus (HCV) subgenomic replicon cell system to evaluate the effect of ethanol on HCV replication and viral protein synthesis. Our results demonstrated that alcohol stimulates HCV replicon expression at both HCV-RNA and protein levels. Interestingly, we observed that ethanol up-regulated COX-2 protein expression and activity in Huh7 replicon cells, nevertheless ASA blocked this induction. Therefore, we suggest that COX-2 probably modulates the effect of ethanol on HCV replication.

**Keywords:** Ethanol, Acetylsalicylic acid, Hepatitis C virus, Cyclooxygenase-2.

## Agradecimientos

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

## Referencias

1. Global surveillance and control of hepatitis C.



- Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 1999; 6:35-47.
2. Highleyman L. Natural history and treatment of hepatitis C. *Beta* 1999;12:16-29.
  3. Feld J. J., Hoofnagle J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005;436:967-72.
  4. Bartenschlager R., Lohmann V. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res* 2001;52:1-17.
  5. Penin F., Dubuisson J., Rey F. A., Moradpour D., Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:5-19.
  6. Tanaka T., Kato N., Cho M. J., Sugiyama K., Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J. Virol* 1996;70:3307-12.
  7. Kolykhalov A. A., Feinstone S. M., Rice C. M. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J. Virol* 1996;70:3363-71.
  8. Lieber C. S. Alcohol and hepatitis C. *Alcohol Res Health* 2001;25:245-54.
  9. Méndez-Sánchez N, Aguilar-Ramírez J. R., Reyes A, Dehesa M., Juárez A., Castaneda B, Sánchez-Ávila F., Poo J. L., Guevara González L, Lizardi J., Valdovinos M. A., Uribe M., Contreras A.M., Tirado P., Aguirre J., Rivera-Benítez C., Santiago-Santiago R., Bosques-Padilla F., Muñoz L., Guerrero A., Ramos M., Rodríguez-Hernández H., Jacobo-Karam J. Etiology of liver cirrhosis in Mexico. *Ann Hepatol* 2004; 3:30-3.
  10. Di Bona D., Cippitelli M., Fionda C., Camma C., Licata A., Santoni A., Craxi A. Oxidative stress inhibits IFN-alpha-induced antiviral gene expression by blocking the JAK-STAT pathway. *J Hepatol* 2006;45:271-9.
  11. Zhang T, Li Y, Lai J.P, Douglas S. D., Metzger D.S., O'Brien C. P., Ho WZ. Alcohol potentiates hepatitis C virus replicon expression. *Hepatology* 2003;38:57-65.
  12. Waris G., Siddiqui A. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J. Virol* 2005;79:9725-34.
  13. 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.
  14. Iníguez M. A., Martínez-Martínez S., Punzon C., Redondo J. M., Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 2000;275:23627-35.
  15. Rivas-Estilla A. M., Svitkin Y., López Lastra M., Hatzoglou M., Sherker A., Koromilas A. E. PKR-dependent mechanisms of gene expression from a subgenomic hepatitis C virus clone. *J Virol* 2002;76:10637-53.
  16. Fuerst T. R., Niles E. G., Studier FW, Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8122-6.
  17. de Wet J. R., Wood K. V., De Luca M., Helinski D. R., Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987;7:725-37.
  18. Pessione F., Degos F., Marcellin P., Duchatelle V., Njapoum C, Martinot-Peignoux M., Degott C., Valla D., Erlinger S., Rueff B. Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;27:1717-22.
  19. Wiley T. E., McCarthy M., Breidi L., McCarthy M., Layden T. J. Impact of alcohol on the histological and clinical progression of hepatitis C infection. *Hepatology* 1998;28:805-9.
  20. Harris D. R., Gonin R., Alter H. J., Wright E. C., Buskell ZJ, Hollinger F.B., Seeff L.B. The relationship of acute transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. *Ann Intern Med* 2001;134:120-4.
  21. Núñez O., Fernández-Martínez A., Majano P. L., Apolinario A., Gómez-Gonzalo M., Benedicto I., López-Cabrera M., Bosca L., Clemente G., García-Monzón C., Martín-Sanz P. Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix

- metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut* 2004;53:1665-72.
22. Rivas-Estilla A. M., Panduro A. [Molecular mechanisms of the hepatitis C virus, potential therapeutic targets]. *Rev Invest Clin* 2003;55:51-64.
23. Lieber C. S. [Pathogenesis of alcoholic liver injury (author's transl)]. *Leber Magen Darm* 1979;9:157-70.
24. Plumlee C. R., Lazaro C. A., Fausto N., Polyak S. J. Effect of ethanol on innate antiviral pathways and HCV replication in human liver cells. *Virology* 2005;2:89.

*Recibido: 7 de septiembre de 2007*  
*Aceptado: 17 de septiembre de 2007*