



SAM disminuye la replicación de VHC mediante regulación de procesos celulares

Sonia Amelia Lozano Sepúlveda*, Paula Cordero Pérez**,
Linda Muñoz Espinosa**, Ana María Rivas Estilla*

RESUMEN

El agente etiológico de la hepatitis C crónica es el VHC, el cual es un virus que desencadena estrés oxidativo celular; sin embargo, el mecanismo involucrado es desconocido. En este trabajo se encontró que s-adenosil metionina (SAM) inhibe la replicación del VHC a nivel transcripcional y traduccional a una dosis de 1mM durante 24-72 h. Se demostró que SAM es capaz de modular negativamente la actividad de quimotripsina del proteasoma y el efecto se potencia al combinar un inhibidor del proteasoma (MG132) con SAM. Además, la adición de SAM estimula la biosíntesis de GSH en el contexto de la infección por VHC.

Palabras clave: VHC, SAM, GSH, proteasoma, Estrés oxidativo.

La hepatitis C es una de las enfermedades infecciosas de gran importancia médica a nivel mundial, por el significativo número de personas infectadas (~200 millones de individuos) en el mundo (WHO, 2015). En México, la hepatitis C figura dentro de las principales causas de cirrosis hepática (Valdespino *et al.*, 2007). El VHC es el agente causal de la hepatitis C y se encuentra clasificado dentro del género *Hepacivirus* en la familia *Flaviviridae*. El genoma del VHC consiste de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva y que codifica para una poliproteína que contiene las proteínas estructurales, las cuales forman la partícula viral; la proteína del core y las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2. Las proteínas no estructurales incluyen el canal iónico P7, la proteasa NS2-3, la serin proteasa NS3 y la RNA helicasa, el polipéptido NS4A, las proteínas NS4B y NS5A; y la NS5B, que corresponde a la polimerasa dependiente de RNA (Lindenbach y Rice, 2005).

ABSTRACT

The etiological agent of chronic hepatitis C is the VHC which is a virus that trigger the cellular oxidative stress; however, the mechanism involved is yet unknown. This current work found that S-adenosyl methionine (SAM) inhibit the replication of VHC in a transcriptional and translational to a dose of 1mM during 24-72 h. It was demonstrated that SAM is able to negatively adjust the activity of chymotrypsin from the proteasome and the effect is capable to combine a proteasome inhibitor (MG132) with SAM. Moreover, the addition of SAM stimulate the biosynthesis of GSH in context with the VHC infection.

Keywords: VHC, SAM, GSH, Proteasome, Oxidative Stress.

Actualmente, el tratamiento para Hepatitis C consiste en la combinación de agentes antivirales de acción directa, como sofosbuvir (FDA, 2013), ledipasvir, daclatasvir (USFDA, 2015), asunaprevir, paritaprevir, ombitasvir, dasabuvir, elbasvir y grazoprevir (Tamori, Enomoto y Kawada, 2016; EASL, 2015). Estos nuevos esquemas confieren una respuesta viral sostenida mayor a 95% en la mayoría de los genotipos, incluido el genotipo 1, que es el más prevalente en México.

Uno de los retos, una vez que se elimine al virus con el uso de los nuevos antivirales, es tratar la enfermedad hepática remanente, ya que los antivirales sólo están dirigidos para bloquear la replicación viral. Una terapia ideal contra la hepatitis C crónica involucra el tratamiento con antivirales de acción directa y un agente antifibrótico, lo cual será uno de los retos en los próximos años (Arif, Levine y Sanderson, 2003).

*Laboratorio de Infectología Molecular, Facultad de Medicina.

**Unidad de Hígado, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".
soniachan_@hotmail.com

En 2011, Feld *et al.* reportaron la adición de s-adenosil metionina (SAM) en el retratamiento de pacientes con hepatitis C no respondedores, combinado con PEG-IFN+RBV (Feld *et al.*, 2011), encontrando que 53% de los pacientes tuvieron respuesta viral temprana y 39% presentaron RVS. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual SAM tiene este efecto en la replicación del VHC. SAM se utiliza como antioxidante y para tratar hepatopatías colestásicas, sólo de forma reciente se ha empezado a estudiar su efecto en la replicación del VHC tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por todo lo anterior, en este trabajo se estudiaron los posibles mecanismos por los cuales SAM ejerce su efecto antiviral, con la finalidad de generar mayor conocimiento acerca de los mecanismos de patogenicidad del VHC, lo cual es de utilidad para la identificación de blancos terapéuticos que pudieran potenciar el efecto de la terapia antiviral actual.

METODOLOGÍA

Cultivo de células y tratamiento con SAM

Se utilizó una línea celular de hepatoma humano, Huh7-VHC replicón, que contiene un replicón subgenómico del VHC genotipo 1b que expresa las proteínas no estructurales del VHC (Lohmann *et al.*, 1999). Las células fueron cultivadas en medio ADMEM suplementado con 2% de SBF, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de glutamina y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin). Las células se cultivaron en una atmósfera de CO₂ de 5% a 37°C. Para los diferentes ensayos, las células se sembraron un día antes y luego fueron tratadas con SAM 1mM de 0-72h.

Cuantificación del RNA de VHC por qPCR

Células Huh7 VHC-replicón fueron sembradas y tratadas con SAM 1mM por 24-72h. El RNA total de los tiempos, 24, 48 y 72h, fue extraído utilizando TRizol, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los precipitados de RNA se lavaron una vez en etanol 75% y se resuspendieron en 30 µL de agua libre de RNAsas. Se sintetizó el cDNA a partir del RNA obtenido. Los cDNAs fueron sometidos a qPCR para la detección de VHC y de tres genes endógenos, Ribosomal

18S (RPS18), actina y GAPDH, que fueron utilizados como genes normalizadores en el cálculo de cuantificación relativa por $\Delta\Delta Ct$. Las reacciones se llevaron a cabo con 100 ng de cDNA por triplicado, utilizando los primers y sondas específicas para cada gen.

Cuantificación de la expresión de NS5A por western blot

Se sembraron células Huh7 VHC-replicón y se trataron como se mencionó previamente. Se extrajo la proteína total a las 24, 48 y 72 h postratamiento, utilizando un buffer de lisis de proteínas. Se determinó la concentración de proteína total por el método de Bradford. Cantidades iguales de proteína se separaron en un SDS-PAGE a 12% y fueron transferidas a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con uno de los anticuerpos antiNS5A y antiactina. La detección se realizó usando el reactivo Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent. Se realizó cada experimento por triplicado.

Cuantificación de glutatión total y relación GSH/GSSG

La detección de GSH (glutatión reducido) y GSSG (glutatión oxidado) se realizó mediante el método de reciclamiento de Ellman. Se leyó la absorbancia a 405-414 nm para obtener la estimación de la concentración de glutatión en la muestra. Células Huh7 VHC-replicón fueron tratadas con SAM 1 mM, durante 1, 2, 6, 12 y 24 h. Las células se lisaron mediante ciclos de congelación y descongelación en PBS 1X. GSSG se midió mediante la derivatización de GSH con 2-vinilpiridina. El espectrofotómetro XMark TM de microplacas se utilizó para la medida de absorbancia usando un filtro de 415 nm.

Ensayo de actividad del proteasoma de tipo quimotripsina

El ensayo *in vitro* de la actividad de quimotripsina del proteasoma 26S, consistió en una reacción de fluorescencia basada en la liberación del fluoróforo 7-amido-4-metilcumarina (AMC) del péptido sustrato, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC; la cual se lleva a cabo si la actividad de tipo quimotripsina está presente en las células. Las células Huh 7 VHC-replicón fueron recolectadas, se extrajo y cuantificó proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA), y se utilizaron 20 µg

de proteína para el ensayo de actividad de proteasoma adicionando 20 μ M del sustrato fluorogénico comercial. El AMC liberado por la hidrólisis fue monitoreado cada 30 min de adicionado el sustrato por 3h/380 nm excitación y 460 nm emisión. Se cuantificó la actividad de quimotripsina del proteasoma a las 12-72 h de células tratadas y no tratadas con SAM; además se utilizó MG132 (1 μ M), un inhibidor del proteasoma, como control positivo de inhibición de la actividad del proteasoma; se realizó además una combinación de los tratamientos de SAM y MG132. Los resultados se muestran en unidades relativas de fluorescencia (RFU, del inglés, relative fluorescence units).

Análisis estadístico y software utilizados

Los experimentos se realizaron al menos tres veces y cada condición por triplicado. Los resultados fueron evaluados por ANOVA o *t* student utilizando el programa SPSS versión 17.0 se consideró una diferencia significativa, cuando el valor de *p* fue menor a 0.05 o 0.01.

RESULTADOS

SAM disminuye la replicación del VHC y la expresión de la proteína no estructural NS5A

Se realizó el análisis de la expresión del RNA-VHC, por medio de qPCR, para lo cual se sembraron células Huh7-VHC replicón; al día siguiente se inició el tratamiento con SAM 1mM, y enseguida se adicionó el tratamiento de PEG-IFN (1000 UI/ml) y RBV (50 μ M), se extrajo RNA total una vez cumplido el tiempo de tratamiento, 0-72 h. Se sintetizó el cDNA por retrotranscripción y se prosiguió con la cuantificación del RNA viral por qPCR. El análisis se hizo por medio de cuantificación relativa $\Delta\Delta C_t$, dando al control sin tratamiento el valor de 1. El tratamiento con PEG-IFN+RBV, uti-

lizado como control positivo de inhibición de la replicación del VHC, mostró la inhibición esperada a los diferentes tiempos evaluados. El nivel de RNA-VHC en presencia de SAM en monoterapia disminuyó a un 50% a las 24h y tal efecto fue tiempo dependiente, mostrando una inhibición de 60% a las 72h postratamiento. En la terapia combinada se observó un efecto aditivo de inhibición de la expresión del RNA-VHC (figura 1).

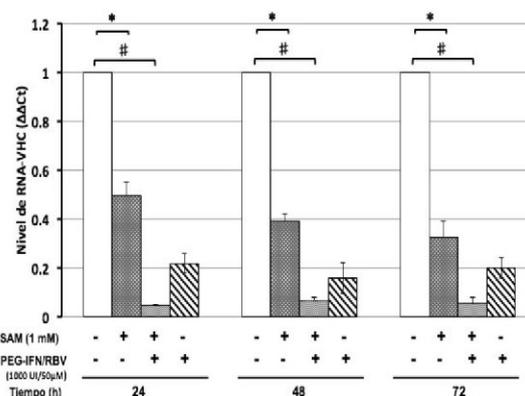


Figura 1. Expresión de RNA-VHC por qPCR. Se cuantificó el RNA-VHC mediante qPCR utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$, dándole el valor de 1 al control sin tratamiento. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones. **p* ≤ 0.01 comparación SAM vs. Control. # *p* ≤ 0.01 comparación SAM+PEG-IFN+RBV vs. Control.

Con la finalidad de determinar si el tratamiento con SAM modifica la expresión de las proteínas virales, se realizó un ensayo para extraer proteínas totales, se adicionó el tratamiento con SAM y tratamiento con PEG-IFN+RBV, se extrajo la proteína total a las 0, 24, 48 y 72 h posteriores al inicio del tratamiento. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford y se procedió a realizar el western blot para detectar los niveles de la proteína viral NS5A usando como control de carga un anticuerpo contra β -actina. Se observó una disminución de la proteína NS5A de 40-60% durante los tres tiempos evaluados, comparando con el control de células Huh7-VHC replicón sin tratamiento (figura 2), de esta manera se confirmó que el efecto es a nivel transcripcional y traduccional. En el control positivo, PEG-IFN+RBV, se observó el efecto de disminución esperado.

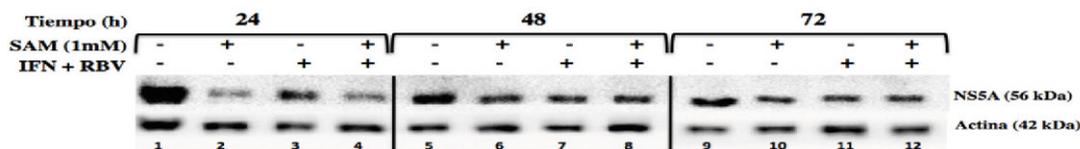


Figura 2. Western blot de la proteína no estructural NS5A y de β -actina. Imagen representativa de tres repeticiones.

SAM estimula la biosíntesis de glutatión

Se evaluó la concentración de glutatión total por el método de Ellman. En presencia de SAM la síntesis de GSH se incrementa desde las 6h postratamiento. En cuanto a la relación glutatión reducido/oxidado no se observaron cambios significativos durante los diferentes tiempos en el tratamiento (figura 3).

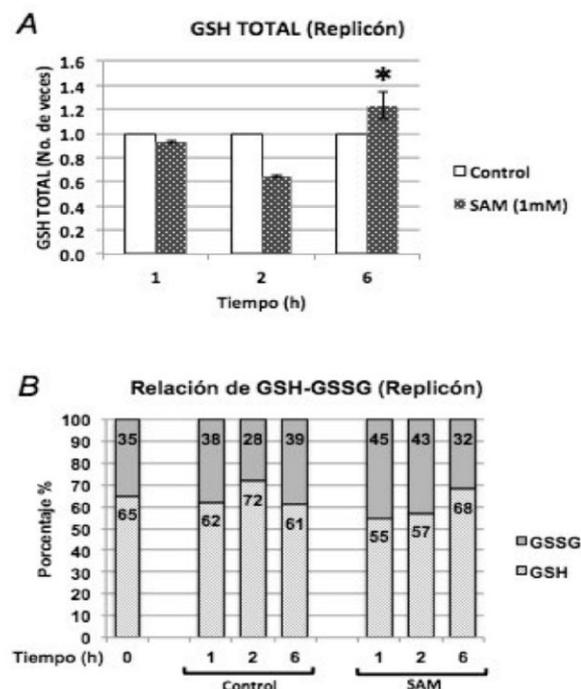


Figura 3. Cuantificación de GSH y GSSG en células Huh7-VHC replicón. A. Ensayo de cuantificación de glutatión total en células Huh7-VHC replicón y, B. la relación de glutatión reducido-glutatión oxidado.

SAM disminuye la actividad catalítica de tipo quimotripsina del proteasoma

Se midió la actividad del proteasoma utilizando un método de fluorescencia. Se sembraron células Huh7-VHC replicón, se trataron con SAM 1mM, MG132 1 μ M y la combinación de ambos. Se lisaron las células a diferentes tiempos 12, 24, 48 y 72h postratamiento. La actividad quimotripsina fue medida usando un sustrato fluorogénico para la actividad catalítica de quimotripsina que reside en la subunidad 20S del proteasoma (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). Se realizó una cinética midiendo la fluorescencia (380 nm excitación, 460 nm emisión) cada 30 min una vez añadido el sustrato. En la figura 4 se resumen los resultados obtenidos para los di-

ferentes tiempos y condiciones. SAM disminuye la actividad de quimotripsina a las 24, 48 y 72 h (10-20%) y al combinar los dos agentes el efecto es mayor comparándolo con el control positivo de inhibición (MG132) alcanzando una inhibición de alrededor de 20-30% más que el control positivo.

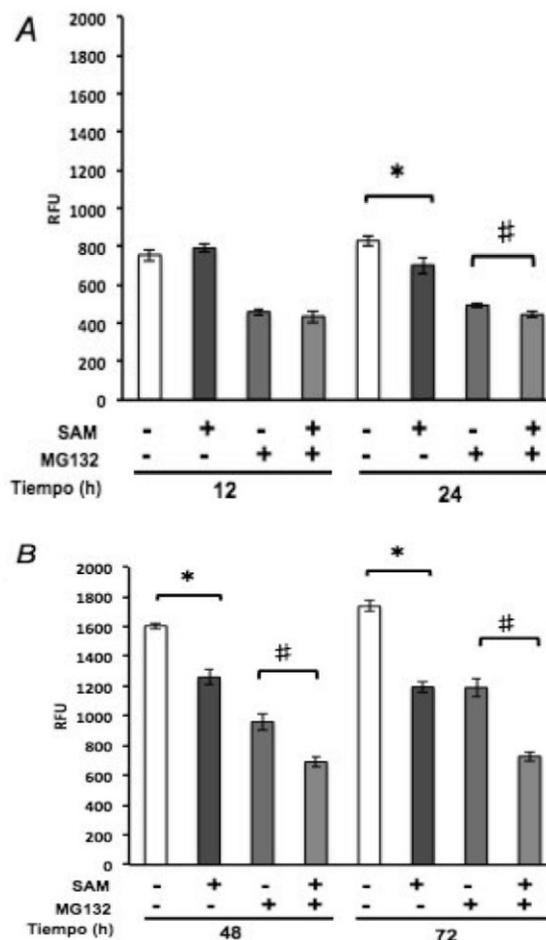


Figura 4. Actividad de tipo quimotripsina del proteasoma. Células Huh7-VHC replicón en presencia de SAM comparadas con los controles sin tratamiento. Se evaluó la fluorescencia directamente proporcional a la actividad del proteasoma a las A.12 y 24 h y B. 48 y 72 h. Se indica con un signo de - o + la adición de los diferentes tratamientos. p<0.05 *comparado vs. Control, ***comparado vs. MG132.

DISCUSIÓN

En 2011, reflejando la búsqueda de alternativas al tratamiento de PEG-IFN y RBV, se demostró la actividad antiviral de SAM, frente a la infección in vivo e in vitro de VHC, en un esquema combinado con PEG-IFN, en ese entonces el tratamiento estándar. Feld *et al.* reportaron datos acerca del posible mecanismo de acción de SAM. En dicho estudio sugirieron que SAM es capaz de potenciar el efecto antiviral de PEG-IFN, basándose

en que SAM puede estar relacionado a una respuesta viral temprana (Feld *et al.*, 2011). En el presente trabajo, demostramos que SAM regula la expresión del VHC por sí solo (sin la participación de PEG-IFN y RBV), en una línea celular de hepatoma que expresa las proteínas no estructurales del virus (Lozano-Sepulveda *et al.*, 2016). Nuestros resultados concuerdan parcialmente con los de Feld *et al.*, ya que demostramos que SAM posee una acción antiviral contra el VHC sin ayuda de PEG-IFN y RBV. En el reporte de Feld, el efecto *in vitro* de la adición de SAM fue significativo a partir de las 72 h, en terapia combinada con PEG-IFN, mientras que en nuestros experimentos encontramos una disminución de la expresión del VHC (RNA y NS5A) desde las 24 h de tratamiento. La discrepancia observada puede ser debida a la diferencia en las dosis utilizadas en ambos trabajos, la dosis máxima utilizada por Feld *et al.* fue de 1.6 nM, en este trabajo la dosis más alta usada fue de 1mM, sin comprometer la viabilidad de las células (Lozano-Sepulveda *et al.*, 2016). Con nuestros resultados demostramos que SAM disminuye la expresión de VHC en dos niveles; a nivel RNA y a nivel proteína, en este caso la proteína NS5A, con la cual se confirmó la disminución de la expresión del VHC por acción de SAM.

El objetivo principal de este trabajo fue investigar el o los mecanismos de acción de SAM sobre la replicación del VHC. Para ello nos enfocamos en tres principales vías, como antioxidante, como estimulante de la vía de IFN (datos no mostrados) y como modulador del proteasoma. Debido a que SAM es el principal precursor de la síntesis de GSH, se investigó la vía de síntesis de GSH y la relación glutatión reducido/oxidado. En nuestro trabajo encontramos que SAM induce la síntesis de glutatión; sin embargo, el aumento de la síntesis de GSH no tuvo efecto en la generación de ROS en ninguno de los dos niveles evaluados, citosol y mitocondria, de las células que expresan las proteínas virales (datos no mostrados).

Se ha demostrado que la estabilidad de las proteínas virales es regulada por el proteasoma (Shirakura *et al.*, 2007; Moriishi *et al.*, 2010) y que el VHC desencadena la degradación de factores del huésped (Munakata *et al.*, 2007). Por otro lado, se sabe que SAM es capaz de regular la actividad del proteasoma (Tomasi *et al.*, 2012), por tal motivo, en este trabajo se exploró la participación del proteasoma en el mecanismo de SAM contra el VHC. Nuestros resultados muestran que SAM es capaz de disminuir la actividad del proteasoma de manera tiempodependiente y además que esta disminución se mantiene a lo largo del tiempo, aun y cuando sólo se usó una sola administración de SAM, utilizan-

do un inhibidor del proteasoma, MG132, se observó un efecto similar en los tiempos largos de tratamiento. Éste representa un campo que puede explorarse, ya que existen reportes en donde SAM muestra tener acción sobre la sumoilación (Tomasi *et al.*, 2012) (un proceso parcialmente ligado a la ubiquitinación) y se ha sugerido que la proteína NS5A es capaz de sumoilarse y de esta manera llevar a cabo su función como cofactor de NS5B (Lee *et al.*, 2014).

En este trabajo se identificó un nuevo mecanismo de acción de SAM que involucra la disminución de la actividad de quimotripsina, esto es algo que no se había descrito antes en el contexto de infección con el VHC. Los presentes datos facilitan la implementación de nuevos enfoques para investigar la vía de degradación de proteínas por proteasoma, en donde se pueden encontrar blancos terapéuticos que puedan servir como potenciadores en la terapia actual.

REFERENCIAS

- Arif, A., Levine, R., Sanderson, S. (2003). Regression of fibrosis in chronic hepatitis C after therapy with interferon and ribavirin. *Dig Dis Sci.*, 48(7):1425-1430.
- EASL (2015). Easl recommendations on treatment of hepatitis C 2015. *J Hepatol.* 2015;61(2):373-395. doi:10.1016/j.jhep.2014.05.001.
- FDA. (2013). FDA approves Sovaldi for chronic hepatitis C. Disponible en: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm377888.htm>
- Feld, J.J., *et al.* (2011). S-adenosyl methionine improves early viral responses and interferon-stimulated gene induction in hepatitis C nonresponders. *Gastroenterology*, 140(3):830-839. doi:10.1053/j.gastro.2010.09.010.
- Gil, M.P., *et al.* (2001). Biologic consequences of Stat1- independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci.*, 98:6680-6685.
- Krishnan, P., Beyer, J., Koev, G. (2012). Antiviral activity and resistance profiles for ABT-267, a Novel HCV NS5A inhibitor, *in vitro* and during 3-day monotherapy in hev genotype-1 (gt1)-infected treatment-naive subjects. *Hepatology*, 56:1069A.
- Lee, H.S., *et al.* (2014). SUMOylation of nonstructural 5A protein regulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepat.*, 21(10):e108-e117. doi:10.1111/jvh.12241.

- Lindenbach, B.D., y Rice, C.M. (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 436(7053):933-938. doi:10.1038/nature04077.
- Lohmann, V., *et al.* (1999). Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. *Science*, 285(5424):110-113. doi:10.1126/science.285.5424.110.
- Lozano-Sepulveda, S.A., *et al.* (2016). S-adenosyl-L-methionine modifies antioxidant-enzymes, glutathione-biosynthesis and methionine adenosyl-transferases-1/2 in hepatitis C virus-expressing cells. *World J Gastroenterol*, 22(14):3746-3757. doi:10.3748/wjg.v22.i14.3746.
- Moriishi, K., *et al.* (2010). Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 52:411-420.
- Munakata, T., *et al.* (2007). Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog.*, 3:1335-1347.
- Ramana, C.V., *et al.* (2001). Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci.*, 98:6674-6679.
- Rivas E., A.M., *et al.* (2012). Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) induction is implicated in the antioxidative and antiviral activity of acetylsalicylic acid in HCV-expressing cells. *AJP Gastrointest Liver Physiol.*, 302(11):G1264-G1273. doi:10.1152/ajpgi.00237.2011.
- Shirakura, M., *et al.* (2007). E6AP Ubiquitin Ligase Mediates Ubiquitylation and Degradation of Hepatitis C Virus Core Protein. *J Virol.*, 81(3):1174-1185. doi:10.1128/JVI.01684-06.
- Tamori, A., Enomoto, M., y Kawada, N. (2016). Recent Advances in Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C. *Mediators Inflamm*, Vol. 2016, Article ID 6841628, 11 pages, 2016. doi:10.1155/2016/6841628.
- Tomasi, M.L., *et al.* (2012). S-adenosylmethionine Regulates Ubiquitin-Conjugating Enzyme 9 Protein Expression and Sumoylation in Murine Liver and Human Cancers. *Hepatology*, 56(3):982-993. doi:10.1002/hep.25701.
- US Food and Drug Administration. (2015). *FDA Approves New Treatment for Chronic Hepatitis C Genotype 3 Infections*. Disponible en: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm455888.htm>
- Valdespino, J.L., *et al.* (2007). Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿un problema de salud pública emergente? *Salud Publica Mex.*, 49 (SUPPL. 3):395-403. doi:10.1590/S0036-36342007000900011.
- Wang, Y., *et al.* (2013). Induction of interferon- γ contributes to Toll-like receptor-3 activated hepatic stellate cell-mediated hepatitis C virus inhibition in hepatocytes. *J Viral Hepat.*, 20(6):385-394. doi:10.1111/jvh.12040.
- WHO (2015, julio). *Hepatitis C Fact sheet N°164*. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>

Recibido: 8 de septiembre de 2017

Aceptado: 13 de octubre de 2017