

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

Estrategia para bloquear la
entrada del virus de la Hepatitis C
(HCV) en hepatocitos primarios

Alumno/a: *Florencio Mellid, Agueda*

Fecha: Junio 2014

Director/a
Dra. Ana Aguirre Escobar

Curso Académico
2013/14

I. ÍNDICE

	<u>Pág</u>
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1 EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	2
2.2 DIAGNOSTICO DE LA HEPATITIS C.....	8
2.3 LIMITACIONES PARA ESTUDIAR Y/O TRATAR LA PATOLOGÍA.....	9
2.4 TRATAMIENTOS ACTUALES Y FUTUROS: DESARROLLO DE VACUNAS.....	12
2.5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
3. DESARROLLO.....	16
3.1 METODOLOGÍA.....	17
3.2 CRONOGRAMA.....	24
3.3 PRESUPUESTO.....	25
4. CONCLUSIONES.....	26
5. BIBLIOGRAFÍA.....	27

1. RESUMEN

Se ha estimado que actualmente cerca de 170 millones de personas están afectadas del virus de la hepatitis C (HCV). La mayoría de ellas desconocen estar infectadas por este virus hasta que la enfermedad se desarrolla en una etapa avanzada del proceso infectivo. El método actual para tratar esta enfermedad se basa en la administración de interferon ($\alpha 2A$) y de ribarín. Este tipo de tratamiento resulta caro, largo y presenta importantes efectos secundarios; además, sólo resulta efectivo en el 50% de los casos. Todo ello, da muestra de la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos que resulten eficaces para tratar esta enfermedad, que afecta al 3% de la población mundial.

En esta memoria se presenta una propuesta para desarrollar un proyecto de investigación que permita establecer la eficacia de una estrategia original para evitar la entrada de HCV en las células hepáticas. Se propone la utilización combinada de dos anticuerpos contra dos factores esenciales para la entrada HCV en las células hepáticas, como son las moléculas CD81 y SR-BI. La eficacia para reducir la capacidad infectiva del HCV de bloquear individualmente cada una de estas moléculas ha sido previamente demostrada, así que en este proyecto proponemos que un uso combinado de moléculas que bloqueen ambos receptores permitiría avanzar en la búsqueda de vacunas que eviten eficazmente la infección del HCV.

2. INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que cerca de 170 millones de personas están afectadas con el virus de la hepatitis C (HCV). La mayoría de los infectados desconocen que portan la enfermedad hasta que ésta se manifiesta en una etapa avanzada. Tras la infección, aproximadamente un 75-85% de las personas terminan desarrollando hepatitis crónica. Cada año, entre 3 y 4 millones de infecciones ocurren en el mundo y cerca de 300.000 personas mueren en la etapa final de la enfermedad por problemas causados por el HCV en el hígado. La infección por HCV lidera las causas de cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular y transplantes de hígado (Fauvelle *et al.* 2013).

Se cree que estas estimas en cuanto al número de afectados por HCV son poco precisas y que la realidad puede ser mucho más severa ya que existe muy poca información sobre el grado de expansión de las infecciones por HCV en el continente africano debido, fundamentalmente, a la limitada vigilancia en las transfusiones de sangre y a la escasez de ensayos dirigidos a detectar la presencia de Hepatitis C en este continente (Halliday *et al.*, 2011).

El método actualmente más extendido en el primer mundo para tratar esta enfermedad se basa en el uso de interferon ($\alpha 2A$) y de ribarín. Estos tratamientos son caros, largos y presentan efectos secundarios muy importantes. Además, tan solo son efectivos en el 50% de los casos ensayados (Nahmias *et al.*, 2007).

A pesar de los más de 20 años de estudio sobre la Hepatitis C, aún no existe una vacuna disponible. La inexistencia de pequeños animales adecuados para estudiar la infección de esta enfermedad, junto con la habilidad del virus para escapar del sistema inmune del receptor y su alta variabilidad genética, suponen el mayor reto para el desarrollo de una vacuna eficaz (Fauvelle *et al.* 2013). Por tanto, resulta necesarios nuevos tratamiento eficaces, para esta enfermedad que afecta al 3% de la población mundial (Halliday *et al.*, 2011).

2.1 EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

HCV es un miembro de la familia *Flaviviridae*, que envuelve su cadena positiva de RNA de 9,6kb en una pequeña envoltura viral de 60 nm (Figura 1). Su genoma codifica una solo *ORF* que se encuentra franqueado por regiones altamente conservadas. Las zonas que se traducen dan lugar a una poliproteína inactiva de aproximadamente 3.010 aminoácidos, que es procesada por proteasas virales y celulares para conseguir tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y 6 proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4B, NS5A y NS5B) (Fauvelle *et al.* 2013) que conforman la estructura proteica del virus (Figura 1).

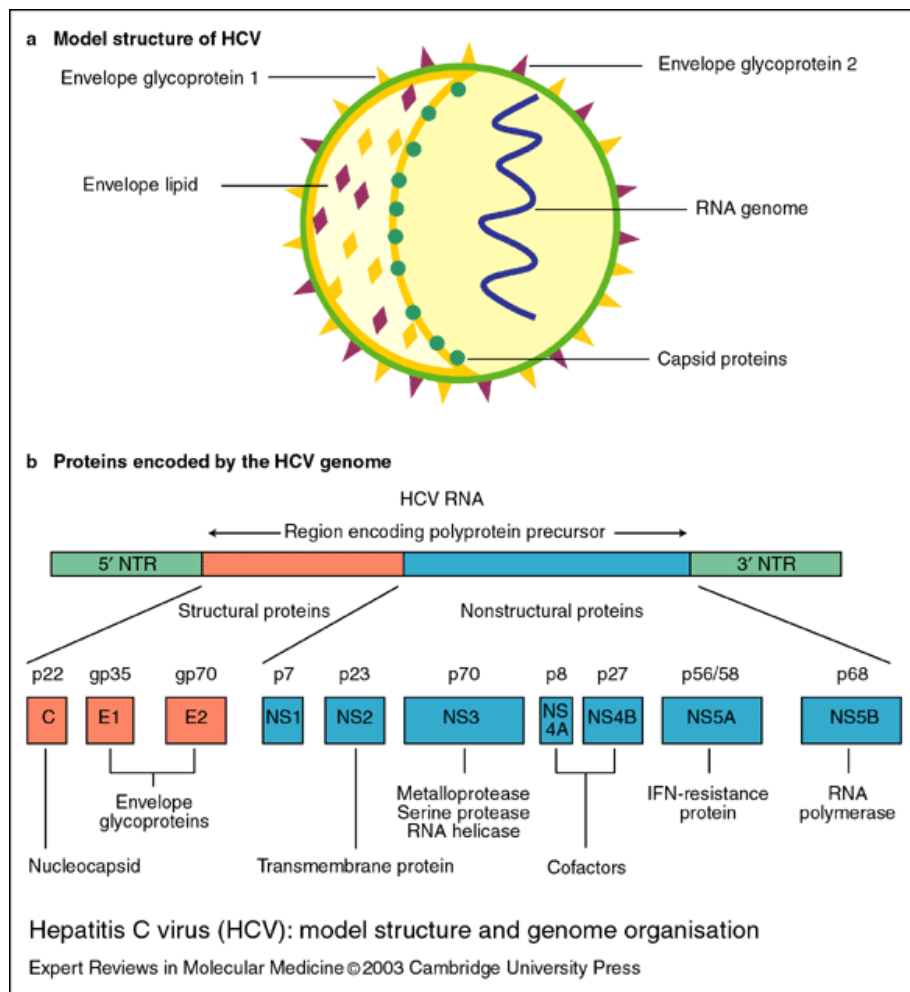


Figura 1: Estructura de una partícula del virus HCV. (a) Modelo de estructura del HCV. La parte izquierda de la imagen muestra la superficie viral compuesta por lípidos y glicoproteínas; la parte derecha muestra el genoma de RNA encapsulado por las proteínas de las cápsida. (b) Proteínas codificadas por el genoma del HCV. El HCV está formado por una partícula con envuelta que alberga una cadena de ARN positiva de ~ 9,6 kb. El genoma lleva un *ORF* que codifica una poliproteína precursora de 3.010 aminoácidos. La traducción del *ORF* se dirige a través de una región no traducida 5' (NTR) de aproximadamente 340 nucleótidos de longitud que permite la unión directa a ribosomas cerca del codón de iniciación del *ORF*. La poliproteína del HCV se escinde co- y post-traduccionalmente por proteasas celulares y virales en diez productos diferentes: las proteínas estructurales [core (C), E1 y E2], situadas en la región N-terminal de la poliproteína, y las proteínas replicativas no estructurales (NS2-5). Se muestran las funciones de los productos de la escisión (Anzola y Burgos, 2003).

El virus HCV tiene una elevada frecuencia de mutación. Debido a ello, modifica fácilmente la secuencia de las proteínas de la envuelta, lo cual le permite escapar de la respuesta inmune del hospedador porque durante la infección de las células hepáticas hay ausencia de anticuerpos específicos contra las nuevas proteínas virales (Liang, 2013). Por otro lado, existen regiones del virus que se encuentran altamente

conservadas como son las regiones core, NS3 y NS5B, probablemente debido a su integridad funcional. Cuando se plantea establecer una estrategia para bloquear la infección por HCV, el problema de la diversidad genética del HCV se puede minimizar utilizando estas regiones conservadas como dianas para el tratamiento contra la infección. Sin embargo, la pregunta sigue siendo cómo conseguir que estas proteínas sean la diana del tratamiento, y resolver esta cuestión sigue siendo un gran reto (Liang, 2013).

Como ya hemos mencionado, un complicado factor de la epidemia del HCV es la alta diversidad genética del virus. Existen 7 subgrupos y la divergencia entre cada grupo supone un 30% de la secuencia de nucleótidos. A pesar de desarrollar las mismas patologías, y ser similar en la transmisión, los distintos genotipos se distribuyen geográficamente en zonas distintas. El genotipo 1 es el más común en Norte América, Europa y Asia, seguido del genotipo 3 y luego del 2. El genotipo 4 es predominante en el Medio Oeste y África y se ha esparcido por numerosos países de Europa. Los genotipos restantes, 5, 6 y 7 son raros (Fauvelle *et al.* 2013).

La infección del HCV se asocia con una inflamación crónica y a cambios en el hígado y en las células hepáticas que son diana del virus, como son la producción anormal de proteínas de la matriz extracelular y una fibrosis progresiva, procesos cuyos detalles moleculares se conocen sólo parcialmente. Cuando la enfermedad avanza, durante un período de años a décadas, la arquitectura del hígado se interrumpe, produciéndose una inflamación de este y la función hepática se ve disminuida. En una proporción significativa de los pacientes infectados, el proceso culmina en un tipo de cirrosis. Esta provoca la formación de tejido cicatrizal que daña la estructura del hígado, bloqueando el flujo de sangre a través del órgano. Esta cirrosis se desarrolla a menudo en silencio y tan sólo resulta sintomática en una etapa tardía de la patología. Las personas con cirrosis asociada a hepatitis C presentan un riesgo particularmente alto de desarrollar carcinoma hepatocelular (HCC) (Yamane *et al.* 2013).

2.1.1 Ciclo del virus

El virus de la hepatitis C completa su ciclo vital en las células del hígado, por lo que la infección por este virus se asocia a enfermedades hepáticas. A pesar de que se desconocen los procesos moleculares exactos y detallados que acontecen en el ciclo vital del HCV, al igual que otros virus, debe completar pasos clave, como la entrada en la célula huésped, la liberación del genoma viral, la traducción de las proteínas virales, la replicación del genoma viral, el ensamblaje y la liberación de viriones. Todos estos eventos se producen fuera del núcleo de la célula huésped (Figura 2).

1. El virus localiza y se une a las células hepáticas que expresan en su superficie receptores para las moléculas del HCV, principalmente CD81 y SR-BI. El HCV utiliza proteínas presentes en su capa lipídica protectora para unirse a estos receptores.
2. El core de proteínas del virus penetra en la membrana plasmática y entra en la célula hepática. Para ello, fusiona su capa lipídica protectora con la membrana externa de las células. Una vez que la capa de lípidos se ha fusionado con éxito a la membrana plasmática, la membrana envuelve el virus.
3. La capa de proteína se disuelve para liberar el ARN viral en la célula. Esto se puede realizar durante la penetración de la membrana celular o mediante enzimas específicos presentes en las células del hígado.
4. El ARN viral comienza la producción de materiales necesarios para la reproducción viral. Debido a que el HCV almacena su información en una cadena de un único sentido de ARN, el propio ARN viral puede ser leído directamente por los ribosomas de la célula huésped, funcionando como un ARN normal presente en la célula. A medida que comienza la producción de las proteínas codificadas en su ARN, el virus apaga la mayor parte de las funciones normales de la célula, lo cual permite la conservación de su energía para la producción de material vírico. Ocasionalmente, el HCV estimula la producción de células hepáticas, lo cual permite crear más células en las que se pueden reproducir los virus. Por esta razón, la hepatitis C se asocia a menudo con el cáncer de hígado.

5. Una vez introducido, el ARN viral crea una versión antisentido de sí mismo como molde para la creación de nuevos ARN virales. El ARN viral se copia cientos o miles de veces, generando el material genético para los nuevos virus.
6. El ARN viral entonces dirige la producción de capsómeros a base de proteínas. Estos son los bloques de construcción para la capa proteica protectora del virus. Los ribosomas crean las proteínas y las liberan para su uso.
7. Los capsómeros completados se reúnen alrededor del nuevo ARN viral para formar nuevas partículas virales. Los capsómeros están diseñados para atraerse entre sí y encajar de una manera determinada. Cuando suficientes capsómeros se reúnen, se auto-ensamblan para formar una capa esférica, llamada cápsida que encapsula completamente el ARN del virus. La partícula completada se llama nucleocápsida.
8. Los virus recién formados viajan a la parte interior de la membrana plasmática y se unen a ella. La membrana plasmática rodea el virus y luego lo libera, proporcionando al virus su capa lipídica protectora, la cual va a ser utilizada más adelante por el virus para unirse a otra célula hepática. Este proceso de brotación y liberación de nuevos virus se mantiene durante horas en la superficie celular hasta que la célula muere de agotamiento (Sklan *et al.*, 2009).

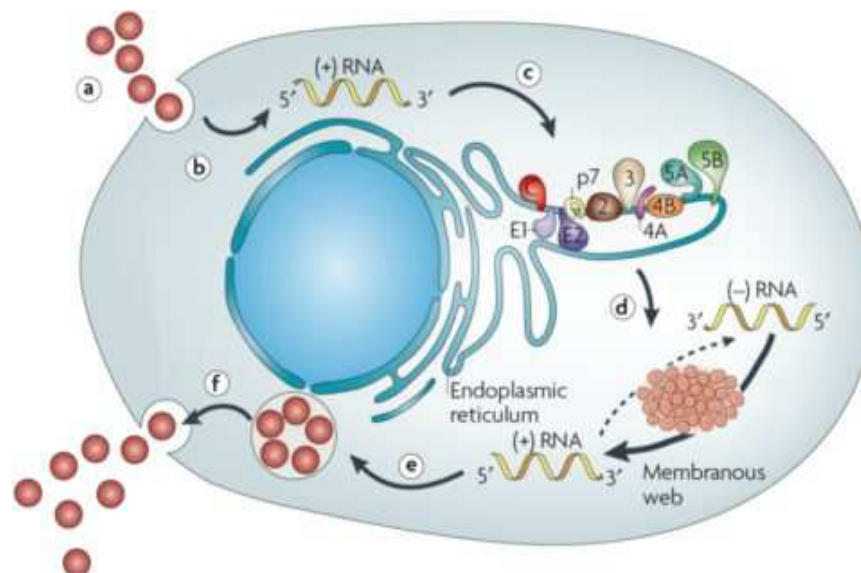


Figura 2. Ciclo de vida del HCV. (a) Unión e internalización del virus, (b) liberación citoplasmática, (c) traducción y procesamiento de la poliproteína, (d) la replicación del ARN, (e) embalaje, (f) la maduración del virión y la liberación. Las proteínas estructurales y no estructurales del HCV se muestra esquemáticamente en la membrana del retículo endoplasmático (Moradpour *et al.* 2007).

2.1.2 Entrada del HCV a los hepatocitos:

La entrada del virus es necesaria para la iniciación, diseminación y mantenimiento de la infección. Dado que el proceso de entrada es común para los diferentes genotipos descritos en el HCV, el estudio y el bloqueo de la entrada del virus constituyen una parte esencial para el control del ciclo viral y una diana prometedora para la terapia antiviral (Zeisel *et al.*, 2013).

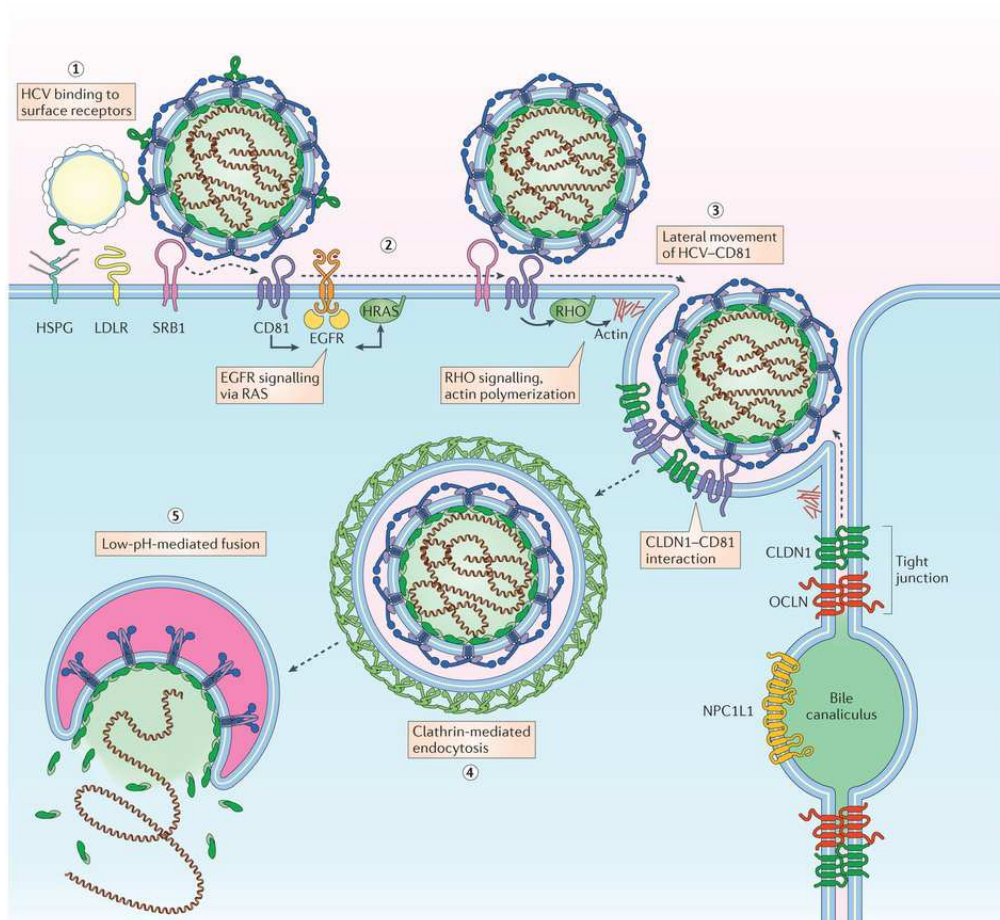


Figura 3. Descripción general de la entrada en la célula del HCV. El proceso de entrada del HCV parece requerir numerosas interacciones con factores de la célula huésped. El virión, que se asocia físicamente con los complejos de apolipoproteínas, se une a una célula huésped mediante la interacción en la superficie celular con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (R-LDL) y glicosaminoglicanos (GAG). Se requieren muchos factores para la entrada del HCV después de la unión del virión a la célula huésped. Estos incluyen el receptor CD81 y del receptor de clase B tipo 1 (SR-B1), seguido de una posterior utilización de la proteína de unión CLDN1. Estas interacciones dan como resultado la endocitosis del virión, donde se fusiona con una membrana endosomal tras la acidificación para liberar la nucleocápside viral (Lindenbach y Rice 2013)

Para infectar una célula, la partícula viral tiene que pasar a través de un proceso de entrada con múltiples etapas, durante el cual, cada paso está estrechamente regulado en tiempo y espacio. El HCV circula asociado físicamente a lipoproteínas como el LDLR. El virus gana el acceso a los hepatocitos entrando por entre las células endoteliales hepáticas (Mirjam *et al.*, 2013) (Figura 3).

2.2 DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS C

Los exámenes de diagnóstico para la hepatitis C se pueden dividir en dos categorías generales:

1. Pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (anti-VHC).
2. Ensayos moleculares que detectan, cuantifican, y / o caracterizan los genomas de ARN del HCV dentro de un paciente infectado.

Los ensayos serológicos se han subdividido en pruebas de detección de anti-HCV, tales como el inmunoensayo enzimático (EIA), y pruebas complementarias, tales como el ensayo de inmuno-transferencia recombinante (RIBA). Tres generaciones de pruebas de anti-HCVs se han desarrollado y cada generación ha dado lugar a una mejora en la sensibilidad de detección de anti-HCV.

Sin embargo, estas pruebas son positivas incluso en personas que han eliminado el virus de su cuerpo. Además, se suelen tardar unos seis meses desde la infección del virus hasta que en el individuo infectado se alcanzan niveles de anticuerpos detectables por estas técnicas, por lo que un resultado negativo no excluye necesariamente una infección recientemente adquirida. Por ello, a las personas que han estado recientemente en riesgo de contraer la hepatitis C se les suele recomendar una repetición de la prueba unos meses después. Si la prueba de anticuerpos es positiva, entonces se necesita un análisis más exhaustivo mediante PCR, para detectar si el virus está todavía presente. Las pruebas mediante PCR también se suelen realizar para determinar exactamente qué tipo de virus de la hepatitis C es el responsable de la infección (Gretch 2003). Para ello, se utilizan ensayos mediante qRT-PCR, los cuales permiten ahorrar tiempo y mejoran la reproducibilidad,

sensibilidad, detección y genotipado del virus de la hepatitis C (Davalieva *et al.*, 2014).

2.3 LIMITACIONES PARA ESTUDIAR Y/O TRATAR LA PATOLOGÍA

Existen dos problemas básicos para el estudio y tratamiento de la hepatitis C: la evasión del sistema inmune del hospedador por parte del HCV y el sistema modelo para el estudio de esta enfermedad.

2.3.1 Mecanismo de evasión del HCV

A diferencia de otros virus, el HCV no puede permanecer latente en las células infectadas. El virus de la hepatitis C ha desarrollado muchos mecanismos para evadir y contrarrestar el efecto de la respuesta inmune del hospedador. A nivel de virus, puede “escondarse” de la respuesta de los anticuerpos y puede pasar de célula a célula sin que sea expuesto a ningún anticuerpo por los complejos del sistema inmune. A nivel celular, el virus puede bloquear la inmunidad innata inhibiendo la inducción y acción del interferón. También se ha demostrado que HCV interfiere en la presentación del antígeno por parte de las células dendríticas y en la función antiviral de las células NK (Liang, 2013).

2.3.2 Sistema modelo

La ausencia de modelos animales supone el mayor obstáculo para el desarrollo de una vacuna. Los únicos animales modelo que pueden ser infectados por el virus son los chimpancés (Liang, 2013). Dada su similitud con el genoma humano, es la única especie susceptible a la infección del virus, si bien cuando se infectan, no desarrollan fibrosis, cirrosis, ni carcinomas, a diferencia de lo que ocurre en humanos (Billerbeck *et al.*, 2013). Por otro lado, el alto coste y la escasa oferta de chimpancés limita la estadística de los estudios y a pesar de que los exámenes de vacunas de HCV en chimpancés están considerados aceptables por Instituto de Medicina US, estas limitaciones entorpecen los ensayos preclínicos (Liang, 2013).

Sistemas de ratones químericos, a los cuales se les han implantado hepatocitos humanos, soportan una infección y la replicación del HCV, por lo que estos modelos han sido utilizados en ocasiones para desarrollar anticuerpos neutralizantes, para analizar las interacciones de los receptores del virus y para ensayar intervenciones terapéuticas (Liang, 2013). Sin embargo, debido a su inmunodeficiencia, estos ratones no pueden ser usados para el estudio de la inmunidad adaptativa o para estudios sobre la fase de infección crónica.

Por ello, se están realizando esfuerzos para mejorar este tipo de modelos y se está trabajando activamente para desarrollar ratones transgénicos susceptibles a la infección del HCV. La mayoría de ellos se centran en los denominados “genetically humanized mouse”, que permiten la entrada del virus expresando en las células de los ratones los genes humanos necesarios (CD81, SCARB1, CLDN1 y OCLN) (Billerbeck *et al.*, 2013). Otros pequeños animales han sido también considerados, como por ejemplo la musaraña del árbol, si bien su uso y reproducibilidad todavía no están claros.

Sin embargo, a pesar de que los animales modelo son útiles en el estudio de la patología y en el diseño y desarrollo de vacunas, pueden no representar de manera fiel la respuesta y la eficacia que podrían tener en humanos, así que otras alternativas o modelos siguen siendo necesarios.

A los problemas para encontrar modelos adecuados se añade otra cuestión técnica no menos importante, como es que, debido a su capacidad infectiva, la utilización para ensayos del virus de la hepatitis C, sin modificaciones, queda descartada, a no ser que se trabaje en condiciones de seguridad biológica de nivel 3. Por ello, se han desarrollado modelos en los que se modifica el HCV para reducir el riesgo de infección (Garrick y Stamataki, 2012). Hasta el año 2005 no existió un modelo robusto que permitiese propagar el virus HCV trabajando en cultivos celulares (HCVcc). No obstante, se habían desarrollado otros modelos para el estudio de la biología del HCV, como son el replicón de HCV, los pseudovirus (HVCpp), las proteínas recombinantes virales o el uso de partículas similares al virus.

Las pseudopartículas de HCV (HCVpp) fueron el primer sistema robusto utilizado para estudiar el proceso completo de entrada del HCV en las células huésped. Estas

partículas consisten en partículas retrovirales que tienen heterodímeros de HCV, E1 y E2. El desarrollo de HCVpp ha permitido estudios sobre el mecanismo de entrada y del ciclo vital del virus (Hsu *et al.* 2003). Este sistema se basa en la co-transfección de células 293T, línea empaquetadora, con 3 vectores de expresión, uno que codifica las glicoproteínas E1 y E2 del HCV, otro que codifica las proteínas gag-pol de cualquiera de los virus de la leucemia murina (MLV) o del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el tercero que codifica un gen reportero (Figura 4) (Steinmann y Pietschmann, 2013).

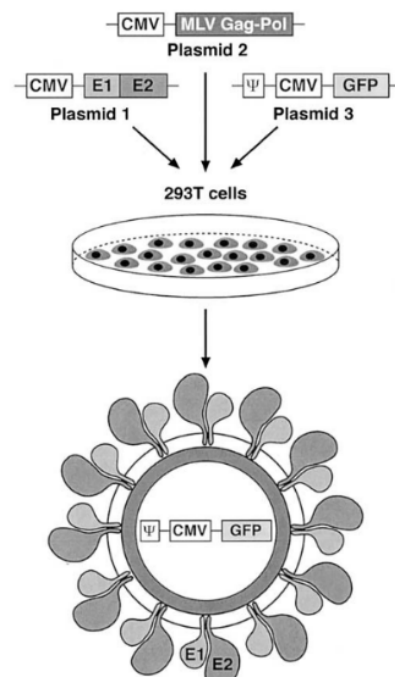


Figura 4. Ejemplo de generación de pseudopartículas de HCV infecciosas (HCVpp). Consiste en la cotransfección de células del riñón de embrión humano 293T con 3 plásmidos que permiten la expresión de (1) glicoproteínas de HCV: E1-E2, (2) proteínas del núcleo retroviral, y (3) una proteína verde fluorescente (GFP). La expresión conduce a la secreción de pseudopartículas que tienen glicoproteínas de la envoltura del HCV en lugar de la envoltura retroviral, en el sobrenadante. CMV, promotor de citomegalovirus; Ψ, secuencia de empaquetamiento retroviral (Bartosch *et al.* 2003).

En el 2005, varios laboratorios informaron de una cepa de HCV que reproducía y liberaba partículas infecciosas directamente en cultivos celulares (HCVcc) (Zhong *et al.* 2005, Lindenbach *et al.* 2005). La cepa fue clonada a partir del cDNA de un virus de genotipo 2a aislado de un paciente japonés con una grave infección por HCV,

bajo el control de un promotor del fago T7 (Figura 5). Este clon se conoce como el clon de la hepatitis fulminante japonesa 1 (JFH-1). A diferencia de los genomas del HCV anteriores, la infección con el genoma JFH-1 en células de hepatoma, como pueden ser la línea Huh7, resulta en la liberación de cápsidas capaces de infectar células. Mediante el uso de los HCVcc se han confirmado los hallazgos realizados con HCVpp, incluyendo la identificación de los co-receptores del HCV, lo cual ha permitido mejorar nuestra comprensión del ciclo de vida del HCV (Garrick y Stamatakis, 2012).

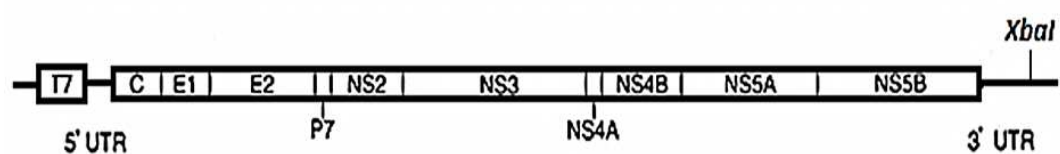


Figura 5: Esquema del cDNA del ARN subgenómico de HCV bajo el control de expresión del promotor del fago T7 (JFH-1).

2.4 TRATAMIENTOS ACTUALES Y FUTUROS: DESARROLLO DE VACUNAS

2.4.1 Tratamiento actual de la Hepatitis C

La terapia actual estándar para la infección por HCV consiste en inyecciones subcutáneas semanales de interferón pegilado (PEG-IFN), combinado con ribavirina por vía oral diariamente durante un período de 24 semanas para los genotipos 2 y 3 y durante 48 semanas para los genotipos 1 y 4. La terapia tiene gran cantidad de efectos secundarios significativos y conduce a una respuesta virológica sostenida (RVS: reducción continua y prolongada de la carga viral; los pacientes son negativos para el virus por RT-PCR 6 meses después de terminar la terapia) en aproximadamente el 40-50 % de los pacientes con infección por genotipo 1, 65-70 % con el genotipo 3 y el 80 % de aquellos con genotipo 2. El PEG-IFN y la ribavirina es un tratamiento caro (tiene un costo promedio de aproximadamente £ 7000 en el Reino Unido para un ciclo de tratamiento), por lo que resulta inasequible en los países en desarrollo (Gieve *et al.*, 2006).

Dos inhibidores de la proteasa viral (telaprevir y boceprevir) se encuentran actualmente en fase III de ensayos clínicos para el HCV y algunos tratamientos adicionales están en desarrollo. Estos medicamentos son sólo eficaces contra la infección por genotipo 1. Debido a que estos medicamentos se pueden usar junto con PEG-IFN/ribavirina, el coste del tratamiento todavía será superior y los efectos secundarios adicionales, como erupciones en la piel, se podrían agravar. El coste de un ciclo de 3 meses de estos inhibidores de la proteasas en el Reino Unido se prevé que alcanzará los £ 18,000-22,000. Muchas otras terapias antivirales directas están en desarrollo, pero es poco probable que alcancen la aplicación clínica en los próximos años (Gieve *et al.*, 2006).

2. 4.2 Ensayos en humanos de vacunas candidatas

A pesar del desconocimiento de cuál es la mejor formulación para una vacuna que induce la inmunidad protectora, dos vacunas candidatas del HCV han sido probadas en estudios con chimpancés y están avanzando a fases clínicas. Una de estas vacunas contiene glicoproteínas recombinantes de la envuelta del virus, E1 y E2, del genotipo 1, formuladas con un adyuvante (MF59). En la fase 1 del estudio en humanos voluntarios (clinical Trials. Gov NCT00500747) esta vacuna en ensayo inducía una respuesta fuerte de producción de anticuerpos que neutraliza la infección del HCV-1 y también HCV-2 (Zeisel *et al.*, 2013).

La otra vacuna candidata se basa en la activación de células T, utilizando dos vectores adenovirales serológicamente distintos, uno de ellos es un adenovirus raro en humanos (Ad6) y el otro es un adenovirus de chimpancé (Ad3Ch3). La vacuna se basa en incorporar los genes no-estructurales, como NS3-NS5B, a los dos adenovirus (Liang, 2013).

Además de estas dos opciones, existe una nueva alternativa en experimentación que consiste en utilizar inhibidores, una posibilidad que aún está en fase preclínica. Existen diversos tipos de inhibidores, por ejemplo:

- 1- Componentes que marcan las partículas lipovirales, es decir, anticuerpos contra la envuelta del virus.
- 2- Componentes que marcan factores esenciales en la entrada del hospedador, por ejemplo, anticuerpos que bloquean CD81, SR-BI, CLDN1, EGFR...
- 3- Componentes que interfieren en la fusión del virus, por ejemplo, arbidol, chloroquina y silymarin.

La focalización en la entrada viral tiene la ventaja de que permite combatir infección viral en las primeras etapas del proceso infeccioso y antes de que el virus empiece a producir material genómico, el cual persistirá en las células infectadas (Fofana *et al.*, 2013).

La entrada del HCV es un proceso multifactorial que afecta a varios receptores de célula huésped, si bien los principales son CD81, un receptor de clase B tipo 1 (denominado SR-BI), claudina-1 (CLDN1) y occludin (OCLN).

Puesto que el proceso de entrada del virus parece una buena diana para el desarrollo de vacunas, vamos a centrarnos en él y, en concreto, en la caracterización de los dos de estos receptores del HCV principales: CD81 y SR-BI.

2.4.3 Bloqueo de CD81

Es un miembro de la familia de proteínas tetraspanin. Fue el primer factor de entrada identificado para el HCV debido a su capacidad de interactuar con la forma soluble de la glicoproteína E2 (sE2). CD81 es un factor de entrada esencial, ya que su silenciamiento en células del hepatoma inhibe la entrada de HCV, mientras que su expresión en células de hepatoma que son resistentes al HCV les confiere susceptibilidad a la entrada de este virus. Es interesante mencionar que varios estudios demuestran que usando anti-CD81 se puede prevenir la infección HCV, lo cual subraya la importancia de CD81 en el control del ciclo viral (Meuleman *et al.* 2008; Fofana *et al.*, 2013).

CD81 no sólo tiene un papel esencial en la entrada del virus sino que también lo tiene en la transmisión célula-célula al infectar células vecinas (Lindenbach *et al.*, 2005; Bartosch *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

Debido a su probado carácter inhibitorio de la infección tanto *in vitro* (Fofana *et al.*, 2013) como *in vivo* (Meuleman *et al.*, 2008), los estudios sobre este receptor han aumentado considerablemente en los últimos años. En el ensayo *in vitro* se consiguió hasta un 90% de disminución en la entrada del virus de una forma dosis-dependiente, utilizando para ello el anticuerpo anti-CD81; el resultado se obtuvo mediante el uso de HCVpp y mediante el uso de HCVcc en líneas de hepatocitos secundarios (Fofana *et al.*, 2013). En el ensayo *in vivo*, usando ratones quiméricos uPA-SCID y a una dosis de 400µg de anti-CD81, se consiguió una protección completa contra el HCV y a las 4 semanas de tratamiento, el RNA del HCV no era detectable en la sangre de los ratones (Meuleman *et al.*, 2008).

2.4.4 Bloqueo de SR-BI

El receptor clase B tipo 1 (SR-BI) es un receptor de lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se expresa en el hígado y modula el metabolismo de los lípidos. El virus HCV es capaz de interactuar directamente con SR-BI y requiere de este receptor para entrar al interior de los hepatocitos y establecer una infección productiva. Se ha demostrado que actúa durante la unión y tras ella en los pasos de entrada del HCV (Zeisel *et al.*, 2007; Haberstroh *et al.*, 2008; Syder *et al.* 2011). Los datos indican que SR-BI juega un papel multifuncional durante la entrada del virus (Zeisel *et al.*, 2007; Haberstroh *et al.*, 2008; Syder *et al.*, 2011).

Con la generación de anticuerpos contra este receptor, SR-BI, se inhibe específicamente la entrada de HCV durante los pasos post-unión y se reduce el porcentaje de infección por parte del virus. Por tanto, los ligandos fisiológicos de SR-BI modulan la infección de HCV. Esto indica que hay un complejo que interactúa entre lipoproteínas, SR-BI y las glicoproteínas de la envuelta de HCV para la entrada de HCV (Catanese *et al.*, 2013).

2.5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los ensayos realizados hasta el momento indican que el bloqueo de la entrada del virus en las células hepáticas es un método prometedor para el desarrollo de vacunas. Dos han sido hasta el momento los receptores que se han estudiado de forma

individual para el análisis de la potencialidad de su bloqueo como sistema eficaz para el desarrollo de vacunas: CD81 y SR-BI. El bloqueo por separado de cada uno de estos receptores genera una drástica reducción de la infección de los hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo* por lo que su uso se plantea como una alternativa de futuro para el desarrollo de vacunas que interrumpan el ciclo viral en sus estadios tempranos. Hipotetizamos que la utilización combinada de anticuerpos que bloqueen los dos receptores esenciales para la entrada de HCV (CD81 y SR-BI) permitiría desarrollar una vacuna eficaz que bloquearía el proceso infectivo más eficientemente que cuando se utiliza uno sólo de los anticuerpos. Esta vacuna serviría para cualquier tipo de cepa viral y evitaría resistencias que podrían aparecer cuando se bloquea únicamente uno de los receptores. Además, consideramos más adecuado ensayar la capacidad bloqueante de esta estrategia utilizando hepatocitos primarios, a fin de utilizar un modelo celular similar a las condiciones naturales de infección.

Para probar la hipótesis anterior, nos hemos planteado como objetivo general establecer un procedimiento experimental para ensayar la capacidad de los HCVcc de infectar hepatocitos primarios tras la utilización combinada de dos moléculas que han mostrado capacidad de inhibir dicho proceso de forma individual (anti-CD81 y anti-SR-BI).

Para este objetivo general, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Obtener HCVcc utilizando cultivos de hepatocitos secundarios
- 2.- Infectar hepatocitos primarios con los HCVcc obtenidos y cuantificar su infectividad
- 3.- Analizar la capacidad infectiva de los HCVcc cuando se utilizan los anticuerpos bloqueantes de forma individual y combinada

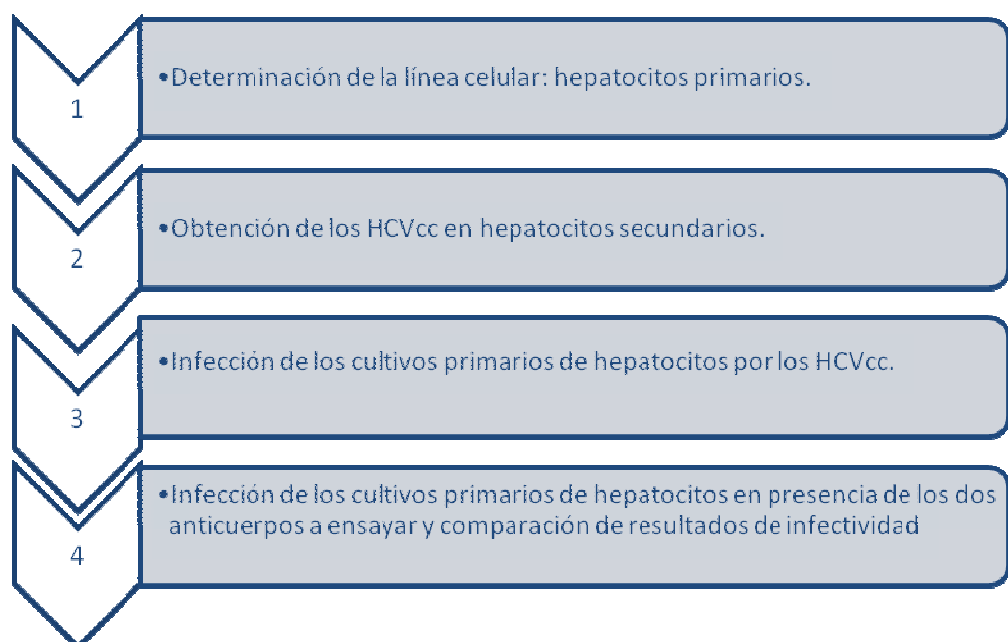
3. DESARROLLO

A continuación se propone el ensayo combinado de dos anticuerpos que, individualmente, han mostrado capacidad de disminuir la infección por HCV mediante el bloqueo de las proteínas que actúan como receptores para la entrada del virus HCV en los hepatocitos (Krieger *et al.*, 2010; Fofana *et al.*, 2013; Meuleman *et*

al., 2012). Para el ensayo se utilizarán cultivos de hepatocitos primarios, por resultar un modelo más cercano a la situación normal que los cultivos de hepatocitos secundarios (Steinmann y Pietschmann, 2013). La determinación de la infectividad se realizará mediante un ensayo con anticuerpos (primarios y secundarios) que permitirá comparar los títulos de infección viral en ausencia de bloqueantes, en presencia de sólo uno de los bloqueantes y en presencia combinada de ambos, expresados como unidades formadoras de focos [ffu/ml)].

En la tabla 1 se describe el procedimiento general que se propone para llevar a cabo el experimento

Tabla 1: Procedimiento propuesto en el proyecto



3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Determinación de la línea celular

Gran cantidad de ensayos sobre la Hepatitis C se realizan utilizando hepatocitos secundarios (Krieger *et al.*, 2010; Fofana *et al.* 2013) debido a su accesibilidad económica y a su vida útil mucho más larga en la cultivo. Sin embargo, estas líneas celulares no reflejan con precisión el perfil de expresión de un hepatocito (Mowbray,

2011). Para este proyecto proponemos utilizar hepatocitos primarios, ya que a pesar de sus desventajas, en cuanto a su escasa disponibilidad y limitada capacidad de proliferación, proporcionan un modelo *in vitro* más cercano a la célula huésped natural del HCV (Steinmann y Pietschmann, 2013). Además, un estudio realizado por Podevin *et al.* 2010 demuestra que es posible producir títulos significativos de partículas HCV infecciosas en hepatocitos primarios de individuos adultos, partículas que son secretadas, que tienen una densidad de flotación baja y una alta infectividad específica, y que muestran características similares a las partículas de HCV producidas *in vivo*. Estos hallazgos sugieren que los hepatocitos primarios representan el modelo fisiológico *in vitro* más adecuado para estudiar la infección por el VHC que el uso de líneas celulares (Garrick y Stamataki, 2012).

Para ello, se utilizarán cultivos primarios de hepatocitos adquiridos en **Clonetics™**, distribuidos por la casa Lonza. Las células serán cultivadas según las recomendaciones de la casa, durante el menor número de ciclos posible.

3.1.2 Obtención de los HCVcc en hepatocitos secundarios

EL HCV, con al menos 7 genotipos y numerosos subtipos, es un miembro del género hepacivirus (Lindenbach *et al.*, 2001). El genoma de los *Flaviviridae* es una molécula de ARN de cadena positiva que varía en tamaño de 9,6 a 12.300 nucleótidos, con un marco abierto de lectura (ORF) que codifica una poliproteína de 3.010 aminoácidos o más (Chevalier y Pawlotsky, 2006). Dado el poder infectivo que tiene el virus del HCV se descarta por completo la utilización de este virus sin ninguna modificación del genoma que permita reducir el riesgo de su utilización en el laboratorio.

El método que se utilizará (HCVcc) se basa en la transfección de la línea celular del hepatoma humano, Huh7, con ADN genómico derivado del HCV. Este método consiste en utilizar estas células como productoras de los virus que infectarán las células deseadas. Los virus que estas células crean, tan solo contienen las cápsidas de los virus, los cuales tienen capacidad de unión con las células, pero no tienen capacidad de generar otros virus, ya que carecen de RNA. El JFH-1 es la secuencia consenso del genoma completo del virus HCV; el genoma está clonado en el vector

pUC bajo el control transcripcional del promotor de T7 (Kato *et al.*, 2001). El resultado de la clonación es el plásmido pJFH-1, que tiene aproximadamente 12,4 kb de longitud, expresa resistencia a ampicilina y se pueden propagar en *E. coli*. Una vez purificado el vector pJFH-1, puede ser linealizado en el extremo del genoma de HCV con la enzima de restricción *XbaI* para permitir la transcripción *in vitro* de los genes de JFH-1 (Yu y Uprichard, 2010).

Las ventajas de esta metodología para la generación de HCVcc *in vitro* son (i) la facilidad del procedimiento, (ii) el tiempo reducido, y (iii) la capacidad para generar grandes volúmenes de HCVcc. Además, frente a la alta diversidad genética del virus, el mecanismo de entrada se mantiene igual para todos los genotipos (Zeisel *et al.*, 2013) por lo que con el modelo de HCVcc se puede caracterizar la entrada del virus en las células para los 7 genotipos del HCV. Dado que los virus de ARN acumulan mutaciones cada vez que su genoma se replica, no se recomienda que el virus tenga pases después de la transfección (Yu y Uprichard, 2010).

A continuación se describe el protocolo para la generación de HCVcc tal y como lo describe Yu y Uprichard (2010).

1. Linealización del plásmido pJFH-1: mediante digestión con la enzima *XbaI*.
2. Purificación del plásmido linealizado mediante fenol/cloroformo.
3. Transcripción del genoma JFH- 1 *in vitro*, mediante RNA polimerasa del fago T7 (MAXIscript® SP6 Kit).
4. Purificación del RNA mediante kit de purificación de ARN Ribozol.
5. Preparación de las células intermediarias: cultivo de células Huh7 (hepatocitos secundarios), a un 80% de confluencia y tripsinización.
6. Transfección de las células Huh7 con ARN del HCV mediante electroporación.
7. Extracción de HCVcc infecciosos: cuando las células transfectadas alcanzan una confluencia del 80%, se lisan. Normalmente el tiempo suele ser de 5 o 6 días. El sobrenadante contiene cápsidas del virus pueden ser extraídas y almacenadas a -80 ° C.

3.1.3 Determinación de la infectividad de HCVcc en hepatocitos primarios

Existen muchos métodos para determinar la infectividad del HCV; ensayos con luciferasa o qRT-PCR son ejemplos de ellos. En este caso, utilizaremos los títulos de infección viral, expresados como unidades formadoras de focos [(ffu)/ml], basados en el número discreto de pocillos que contienen las células en monocapas, la dilución del inóculo y el volumen del inóculo. Los HCVcc son no-citolíticos, pero pueden formar pequeños focos de células que son positivas para las proteínas del HCV. Estas pueden ser visualizadas por inmunotinción de las monocapas fijadas de Huh7 infectadas. Para calcular los títulos de infectividad del HCV expresadas como unidades formadoras de foco [(ffu)/ml], el método más adecuado consiste en utilizar una reacción con anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia (Yu y Uprichard, 2010; Zhong *et al.*, 2005).

1. Preparación de las células: cultivo de los hepatocitos primarios hasta los 3×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos con Matrigel Matrix (Corning®) (Krieger *et al.* 2010).
2. Preparar, por triplicado, 10 diluciones de las muestras de HCVcc.
3. Añadir a cada pocillo de hepatocitos primarios, 50µl de cada muestra diluida de HCVcc, por triplicado.
4. A las 72h, fijar las células con 300 µl del tampón de fijación PFA (20g de paraformaldehído). Decantar con DPBS (sin Mg^{+} o Ca^{+}).
5. Añadir 30 µl del anticuerpo primario a cada pocillo. Lavar con 200 µl DPBS los anticuerpos primarios sobrantes. Decantar. Repetir 3 veces.
6. Añadir 30 µl de anticuerpo secundario a cada pocillo. Lavar con 200 µl DPBS los anticuerpos secundarios sobrantes. Decantar. Repetir 3 veces.

La infectividad de los HCVcc se determinará mediante una reacción doble con anticuerpos: como anticuerpo primario se utilizará un anticuerpo de ratón que reconoce la proteína del core del virus de la hepatitis C, anti-Hepatitis C Virus Core, suministrado por Abcam®. Como anticuerpo secundario se utilizará un anticuerpo policlonal de conejo anti IgG de ratón conjugado con Cy3 (Life Technologies).

Para calcular el título en unidades de formación de focos [(ffu)/ml], el resultado de la reacción se analizará en microscopio de luz invertida. Se seleccionarán los pocillos con un número suficiente de los focos para un conteo fiable. Se contarán los focos

producidos, y se realizará la media de cada pocillo por triplicado. Para el cálculo, se seguirá la ecuación (1) (Yu *et al.*, 2005).

$$\text{Título } \left(\frac{ffu}{ml} \right) = n^{\circ} \text{ de focos } \times \left(\frac{1}{\text{factor de dilución del virus en la preparación}} \right)^x \left(\frac{1}{\text{volumen de cada pocillo (ml)}} \right)$$

(1)

3.1.4 Uso de los anticuerpos: anti-CD81 y anti-SR-BI; anticuerpos primarios y secundarios.

En el ensayo para bloquear la infección se utilizarán anticuerpos para dos receptores celulares (CD81 y SR-BI) que utiliza el virus para su entrada en los hepatocitos: el anti-CD81 y el anti-SR-BI, respectivamente.

El anticuerpo correspondiente al receptor CD81, anti-CD81, generalmente se denomina JS81, aunque comercialmente también se conoce como TAPA1 y TSPAN28; es comercializado por BD Bioscience

Como anticuerpo para el receptor SR-BI se utilizará el anticuerpo policlonal denominado SCARB1, suministrado por Abbiotec.

3.1.5 Ensayo de viabilidad de los hepatocitos primarios en presencia de las moléculas a ensayar

Antes de realizar los ensayos de infección en presencia de los anticuerpos, se deberá ensayar el efecto de estos anticuerpos sobre la viabilidad celular sobre los hepatocitos primarios a utilizar, para comprobar que éstos no provocan la muerte celular y que las células puedan desarrollarse de manera correcta sin afectar al metabolismo celular normal. Por tanto, se analizará la viabilidad de los hepatocitos primarios con cada anticuerpo por separado, y con los dos compuestos combinados. Todos los ensayos se realizarán por triplicado.

La viabilidad de las células tras su exposición frente a los anticuerpos anti-CD81 y/o anti-SR-BI se analizará mediante el ensayo MTT. Para ello, las células Clonetics™ se incubarán en placas de 24 pocillos (3×10^5 células/pocillo) con Matrigel Matrix (Corning®) (Krieger *et al.*, 2010) con el anticuerpo a diferentes concentraciones:

anti-CD81 (0, 0.1, 10, 100 µg/ml) (Krieger *et al.*, 2010) y anti-SR-BI (0, 0.08, 0.3, 1.5, 5, 20 µg/ml) (Meuleman *et al.*, 2012). Los hepatocitos se dejarán crecer 24 horas (Dvorak *et al.* 2007). Posteriormente, se analizará mediante el ensayo MTT, por triplicado. Este ensayo se basa en que las células viables con metabolismo activo convierten MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) en un producto de formazano púrpura con un máximo de absorbancia cerca de 570 nm. Cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir MTT en formazano, de este modo la formación de color sirve como un marcador útil y conveniente de tan solo células viables (Krieger *et al.*, 2010).

3.1.6 Infección de los hepatocitos primarios con HCVcc en presencia y ausencia de las moléculas a ensayar

Aunque previamente ya se ha comprobado el efecto inhibitorio individual que tienen las moléculas anti-CD81 y anti-SR-BI frente la infección del HCV en los hepatocitos primarios (Krieger *et al.*, 2010; Fofana *et al.* 2013; Meuleman *et al.*, 2012), en este proyecto se plantea probar nuevamente tal efecto para validar los resultados anteriores y establecer niveles de referencia con los que comprobar el efecto sinérgico de utilizar ambos anticuerpo simultáneamente.

Los hepatocitos primarios que han estado en contacto previo con el anticuerpo serán infectados por los HCVcc. Se espera que los anticuerpos bloqueen la entrada del HCV, lo que se traducirá en un descenso de la infección en los hepatocitos primarios. Cada ensayo se realizará por triplicado.

3.1.6.1 Infección de los hepatocitos primarios por HCVcc en presencia del anticuerpo anti-CD81

Las células Clonetics™ se pre-incubarán durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo anti-CD81 a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/mL) en placas de 24 pocillos (3×10^5 células/pocillo) (Krieger *et al.*, 2010) con Matrigel Matrix (Corning®). El control se realizará con 10 µg/mL de IgG (Fofana *et al.*, 2013), todas por triplicado con los Posteriormente, se incubarán con los HCVcc durante 24 h a 37°C. Después, se seguirá el proceso de determinación de la infectividad descrito anteriormente para el cálculo de títulos en unidades de formación de focos [(ffu)/ml]. Para ello se seguirá el procedimiento descrito en el apartado 3.1.5.

3.1.6.2 Infección de los hepatocitos primarios por HCVcc en presencia del anticuerpo anti-SR-BI

Los hepatocitos primarios se pre-incubarán durante 1 día a 37 °C con una densidad de 3×10^5 células/pocillo con el anti-SR-BI en concentraciones crecientes (0 (control), 0.08, 0.3, 1.5, 5, 20 µg/ml). Después serán infectadas con los HCVcc durante 24 h a 37°C, cada una por triplicado. Se lavará la solución de anticuerpos, y se procederá a la determinación de la infectividad del HCV mediante el protocolo anteriormente descrito para determinar los títulos en unidades de formación de focos [(ffu)/ml]. Para ello se seguirá el procedimiento descrito en el apartado 3.1.5.

3.1.7 EFECTOS SINÉRGICOS

Posteriormente, y una vez validadas las moléculas por separado, se combinarán para comprobar el efecto sobre la infección del HCV. Para comprobar el efecto de la infección con la combinación de las moléculas, se realizará un ensayo en el que estando los hepatocitos primarios en presencia de anti-CD81 y anti-SR-BI, serán infectados por los HCVcc. Posteriormente se medirá la infección producida en estas condiciones. Dada la previa validación de las moléculas, los ensayos combinados se realizarán con las dos concentraciones más efectivas de las dos moléculas. Cada ensayo se realizará uno de ellos por triplicado, para obtener unos resultados más fiables.

3.1.7.1 Anti-CD81 - Anti-SR-BI

Las células Clonetics™ se pre-incubarán en placas con Matrigel Matrix de 24 pocillos (3×10^5 células /pocillo) (Corning®) (Krieger *et al.*, 2010) durante una hora a 37°C con el anticuerpo anti-CD81 y anti-SR-BI a las 2 concentraciones más efectivas obtenidas anteriormente más el control. Posteriormente, los hepatocitos primarios infectadas con los HCVcc durante 24 h a 37°C, cada una por triplicado. Después, se procederá a la determinación de la infectividad del HCV mediante el protocolo anteriormente descrito para determinar los títulos en unidades de formación de focos [(ffu)/ml]. Para ello se seguirá el procedimiento descrito en el apartado 3.1.5.

3.2 CRONOGRAMA

TAREAS	SEMESTRES			
	1-6	7-12	13-18	19-24
Adquisición del material necesario para cultivos, para ensayo MTT, material de biología molecular, etc	●			
Adquisición de células, plásmidos y anticuerpos: <ul style="list-style-type: none"> • Hepatocitos primarios y Cultivos celulares Huh7 • Plásmido pJFH-1 • Anticuerpos JS81, SCARBI, Anticuerpo anti-hepatitis C virus core y anticuerpo secundario conjugado con Cy3 	●			
Obtención de los HCVcc en hepatocitos secundarios: <ul style="list-style-type: none"> • Linealizar y purificar el pJFH-1 • Transcribir <i>in vitro</i> del JFH-1 • Purificar el ARN • Preparar y transfectar las células Huh7 	●	●		
Puesta a punto y ensayos de: <ul style="list-style-type: none"> • Infectividad de HCVcc • Viabilidad en hepatocitos primarios 		●	●	
Determinación de la infección de HVcc en cultivos primarios de hepatocitos: <ul style="list-style-type: none"> • En presencia y ausencia de las moléculas a ensayar individualmente • En ensayos de sinergia con los dos anticuerpos 			●	●
Repeticiones e imprevistos				●
Análisis de resultados				

3.3 PRESUPUESTO

MATERIAL	PRECIO ESTIMADO
Material general: Puntas de micropipeta con y sin filtro, guantes, tubos Falcon, tubos Eppendorf, pipetas, tampones, reactivos, enzimas, material de vidrio, etc	2.500€
Material para cultivos celulares: medios, placas normales y embebidas en Matrigel Matrix, frascos, antibióticos, nitrógeno líquido, etc	5.000€
pJFH-1	Suministrado por el Instituto Metropolitano de Tokyo de Neuriciencias.
Hepatocitos primarios	3.500€
Hepatocitos secundarios: Huh7 (Gibco)	1.000 €
Anticuerpos (JS81, SCARB1, Anti-HCV core, anti-IgG-Cy3)	3.500€
Kit para transcripción <i>in vitro</i> : MAXIscript® SP6 Kit	600€
MTT assay (Vybrant®)	250€
Kit de purificación de ARN	250€
Reparaciones e imprevistos (20%)	3.320€
TOTAL	19.920€

4. CONCLUSIONES

En esta memoria se desarrolla una estrategia para el bloqueo de la entrada del HCV en las células hepáticas mediante el bloqueo simultáneo de dos de los receptores celulares esenciales para la entrada virus en los hepatocitos: CD81 y SR-BI. Ambos han mostrado previamente un bloqueo efectivo individual en modelos celulares de hepatocitos secundarios, pero la utilización combinada de ambos anticuerpos y su utilidad en modelos *in vitro* más cercanos a la situación normal, como son los cultivos de hepatocitos primarios, no ha sido ensayada hasta el momento.

Puesto que el mecanismo de entrada del virus HCV en las células hepáticas es compartido por todos los genotipos del virus que han sido descritos hasta el momento, es de esperar que, de obtenerse un efecto sinérgico de barrera a la infección mediante el bloqueo de ambos receptores, dicho efecto sería aplicable a cualquiera de los tipos de virus HCV.

Nuestra propuesta experimental contempla aportaciones que creemos mejoran los diseños experimentales hasta ahora contemplados en los trabajos que se están realizando en la búsqueda de potenciales dianas para la elaboración de vacunas efectivas contra la propagación del virus de la hepatitis C.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Anzola, M. y Burgos, J.J. 2003. Hepatitis C virus (HCV): model structure and genome organization. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 5: 19.
- Bartosch, B., Dubuisson J., Cosset, F.L. 2003. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1–E2 envelope protein complexes. *Journal of Experimental Medicine*. 197:633–642.
- Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J, *et al.* 2003. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *Journal of Biological Chemistry* 278: 41624–41630.
- Billerbeck, E., de Jong, Y., Dorner, M., de la Fuente, C. and Ploss, A. 2013 Animal Models for Hepatitis C en: *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. [en línea] Volume 369. Ralf Bartenschlager. University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. Pág 49-87. [Consulta 16 de Octubre del 2007] [Disponible en <http://www.springer.com/series/82>]
- Catanese, M.T., Loureiro J., Jones C.T., Dorner M., von Hahn, T., Ricea, C.M. 2013 Different Requirements for Scavenger Receptor Class B Type I in Hepatitis C Virus Cell-Free versus Cell-to-Cell. Transmission. *Journal of Virology* 87: 8282–8293
- Catanese, M.T., Graziani, R., Von Hahn, T., Moreau, M., Huby, T., Paonessa, G., Santini, C., Luzzago, A., Rice, C.M., Cortese, R., Vitelli, A., Nicosia, A. 2007. High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. *Journal of Virology* 81:8063–8071.
- Chevaliez, S. y Pawlotsky, J.M. 2006. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Chapter 1HCV Genome and Life Cycle. Edited by Seng-Lai Tan, PhD. Lilly Research Laboratories, Indianapolis, USA Norfolk (UK): Horizon Bioscience; ISBN-10: 1-904933-20-3.
- Davalieva, K., Kiprikanosvka, S., Pleseska-Karanfilska, D. 2014. Fast, reliable and low cost user-developed protocol for detection, quantification and genotyping of hepatitis C virus. *Journal of Virological Methods* 196:104-112

- Dubuisson, J., Helle, F., Cocquere, L. 2008. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cellular Microbiology* 10 (4): 821– 827.
- Dvorak, Z., Ulrichova, U., Weyhenmeyer, R., Simanek, V. 2007. Cytotoxicity of colchicine derivatives in primary cultures of human hepatocytes. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 151(1):47–52.
- Fafi-Kremer, S., Fofana, I., Soulier, E., Carolla, P., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., Patel, A.H., Cosset, F., Pessaux, P., Doffoël, M., Wolf, P., Stoll-Keller, P., y Thomas, F. 2010. Baumert Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus re-infection in liver transplantation. *Journal of Emergency Medicine* 207: 2019-2031
- Fauvelle, C., Lepiller, Q., Felmlee, D.J., Fofana, I., Habersetzer, F., Stoll-Keller, F., Baumert, T.F., Fafi-Kremer, S. 2013. Hepatitis C virus vaccines--progress and perspectives. *Journal of Microbiological and Pathology* 58:66-72.
- Fofana, I., Xiao, F., Thumann, C., Turek, M., Zona, L., *et al.* 2013. A Novel Monoclonal Anti-CD81 Antibody Produced by Genetic Immunization Efficiently Inhibits Hepatitis C Virus Cell-Cell Transmission. *PLoS ONE* 8(5): e64221.
- Garrick, K.W. y Stamataki, Z. 2012. In Vitro Systems for the Study of Hepatitis C Virus Infection. *International Journal of Hepatology*. ID 292591, 8 pages.
- Gretch D. R. 2003. Diagnostic Tests for Hepatitis C. *Hepatology*. Volume 26, Issue Supplement 3.
- Gieve, R., Roberts, J., Wright, M. *et al.* 2006. Cost effectiveness of interferon α or peginterferon α with ribavirin for histologically mild chronic hepatitis C. *Gut* 55(9): 1332–1338.
- Haberstroh, A., Schnober, E.K., Zeisel, M.B., Carolla, P., Barth, H., Blum, H.E., *et al.* 2008. Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology* 135: 1719-1728.

- Halliday, J., Klenerman, P., Barnes, E. 2011. Vaccination for Hepatitis C Virus. Closing in on an Evasive Target. *Expert Review of Vaccines* 10(5):659-672.
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M. *et al.* 2003. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, (12): 7271–7276.
- Kato, K., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., Wakita T. 2001 Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *Journal of Medical Virology* 64 (3): 334–339
- Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M. *et al.* 2010. Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology* 51:1144–1157
- Lagging, L.M., Meyer, K., Owens, R.J., and Ray, R. 1998. Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus. *Journal of Virology* 72 (5): 3539–3546.
- Liang, J.T. 2013. Current progress in development of hepatitis C virus vaccines. *Nature Medicine* 19, 869–878 doi:10.1038/nm.3183
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., *et al.* 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623–626.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M. 2013. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology* 11: 688–700
- Moradpour, D, Penin, F., Rice, C.M. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews of Microbiology*. 5(6):453-63.
- Meuleman, P., Catanese, M.T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C.T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R., Rice, C.M., Leroux-Roels, G., Nicosia, A. 2012. A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I preclude hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo. *Hepatology* 55:364–372.

- Meuleman, P., Hesselgesser, J., Paulson, M., Vanwolleghem, T., Desombere, I., Reiser, H. and Leroux-Roels, G. 2008. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection *in vivo*. *Hepatology* 48: 1761–1768.
 - Mowbray, C. 2011. In vitro systems to predict hepatotoxicity: models based on hepatocarcinoma cell lines. Newcastle University. Faculty of Medical Sciences Institute of Cell and Molecular Biosciences Epithelial Research Group.
 - Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T. 2007. Apolipoprotein B–Dependent Hepatitis C Virus secretion is inhibited by the grapefruit Flavonoid Naringenin. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).DOI 10.1002/hep.22197.
 - Nakamura, M., Hidetsugu, S., y Hibi, T. 2008. Advances in Genomic Research on Hepatitis C Virus with a Useful Tool, Replicon System. *Keio J Med* 57 (2): 75– 83.
 - Sklan, E.H., Charuworn, P., Pang, F.S., Glen J.S. 2009. Mechanisms of HCV Survival in the Host. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 6: 217-227.
 - Steinmann, E., y Pietschmann T. (2013) Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus En: *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* [en línea]. Volume 369. Ralf Bartenschlager. University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. Pág 17-48. [Consulta 16 de Octubre del 2013] [Disponible en <http://www.springer.com/series/82>]
- Syder, A.J., Lee, H., Zeisel, M.B., Grove, .J, Soulier, E., Macdonald, J., *et al.* 2011. Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors. *Journal of Hepatology*. 54:48-55.
- Thurner, C., Witwer, C., Hofacker, I.L., Stadler, P.F. 2004 Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *Journal of General Virology*. 85:1113–1124
 - Wilson, G.K. y Stamataki, Z. 2012. In Vitro Systems for the Study of Hepatitis C Virus Infection. *International Journal of Hepatology*. Volume 2012, Article ID 292591, 8 pages.

- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T. *et al.* 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* 11 (7): 791–796.
- Yamane, D., McGivern, D.R., Masaki, T. and Lemon, S.M. 2013. Liver Injury and Disease Pathogenesis in Chronic Hepatitis C *En: Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* [en línea]. Volume 369. Ralf Bartenschlager. University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. Pág17-48. [Consulta 16 de Octubre del 2013] [Disponible en <http://www.springer.com/series/82>]
- Yu, X., Uprichard, S.L. 2010. Cell-Based Hepatitis C Virus Infection Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Assay for Antiviral Compound Screening. *Current Protocols in Microbiology*. CHAPTER: Unit–17.5. doi:10.1002/9780471729259.mc1705s18.
- Zeisel, M. B., Daniel, J., Felmlee, y Thomas F. B. 2013. Hepatitis C Virus Entry. *En: Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy* [en línea] Volume 369. Ralf Bartenschlager. University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. Pág 87-112. [Consulta 16 de Octubre del 20013] [Disponible en <http://www.springer.com/series/82>]
- Zeisel, M.B., Koutsoudakis. G., Schnober, E.K., Haberstroh, A., Blum, H.E., Cosset, F.L., *et al.* 2007. Scavenger receptor BI is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *Hepatology* 46:1722-1731.
- Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M., *et al.* 2004. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *Journal of Virology*. 78:1448–1455.
- Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., Chisari, F.V. 2005 Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:9294–9299.