



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Relación entre genotipo del virus de la Hepatitis C y uso de LDLR como cofactor de entrada

Alumno: José Antonio López Cruz

Septiembre, 2015

Índice.

1. Abstract.	3
2. Estructura del HCV.	4
3. Epidemiología de HCV.	10
4. Efectos patológicos del HCV. Efectos metabólicos.	11
4.1. Síndrome dismetabólico asociado a hepatitis C.	11
4.2. Alteraciones del metabolismo lipídico.	13
4.3. Alteraciones en el metabolismo de Lipoproteínas.	14
5. Entrada del virus en el hígado.	16
5.1. Receptores HCV.	17
5.2. Endocitosis de HCV.	19
5.3. Papel de LDLR en la entrada de HCV en el hígado.	20
6. Objetivos.	23
7. Materiales y Métodos.	23
7.1. Aislamiento de las glicoproteínas E1 y E2 de los diferentes genotipos.	24
7.2. Clonación del producto de PCR en vectores plasmídicos.	24
7.3. Análisis de transformantes.	24
7.4. Aislamiento y análisis del ADN recombinante	25
7.5. Secuenciación del inserto.	25
8. Resultados.	25
8.1. Aislamiento de las glicoproteínas E1 y E2 de los diferentes genotipos.	25
8.2. Análisis del ADN recombinante de las bacterias recombinantes.	26
8.3. Cuantificación del plásmido y Ensayo de restricción con EcoRI.	26
8.4. Resultados de la secuenciación.	27
9. Discusión.	32
10. Referencias Bibliográficas.	37

Resumen.

HCV es un flavivirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, cuyo genoma está constituido por una hebra única y positiva de ARN. De acuerdo a la organización mundial de la salud (OMS), aproximadamente un 3% de la población mundial, es decir, unas 170 millones de personas, se encuentran infectadas por el virus de la hepatitis C produciéndose entre 3 y 4 millones de infecciones nuevas cada año y siendo los genotipos 1 y 3 los predominantes en la península Ibérica. La infección por HCV suele estar relacionada con la aparición alteraciones metabólicas de carácter crónico como: Esteatosis hepática, fibrosis, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular además de resistencia a la insulina. El mecanismo por el cual HCV es capaz de entrar al hígado todavía no se conoce de forma completa y se han propuesto varios co-receptores como IL28, SR-B1 y LDLr, los cuales, parecen ser fundamentales para la entrada del virus al hepatocito. El objetivo de este trabajo es la amplificación y purificación de las glicoproteínas de la envuelta de cada uno de los genotipos del virus, desde el genotipo 1 al 6, para evaluar posteriormente, *in vitro*, su capacidad de anclaje a LDLR expresados en células hepáticas, con el fin de determinar la importancia de LDLR en la entrada de HCV en el hígado y el efecto de los diferentes genotipos del virus en su capacidad o necesidad de unirse a este receptor. Los resultados de este estudio han sido la amplificación y clonación de las glicoproteínas de la envuelta de el genotipo 3 del virus, sin llegar a la construcción de HCVpp.

Palabras clave: LDLR, HCV, HCVpp.

Abstract.

HCV is a flavivirus belonging to the *Flaviviridae* virus family, whose genome is formed by a only and positive thread of RNA. According to the World Health Organization (OMS), around the 3% of the global population, meaning 170 million people, are infected by Hepatitis C virus, happening between 3 and 4 new million of infections every year, been the genotypes 1 and 3 the predominant genotypes in the Iberian peninsula. HCV infection is usually associated with the appearance of chronic and metabolic alterations like: Hepatic steatosis, fibrosis, hepatic cirrhosis, hepatocellular carcinoma and insuline resistance. The mechanism because of HCV is able to entry in liver is not completely known yet and there was proposed several co-receptors like, IL28, SR-B1 and LDLR, that seems essentials to the virus entry in the hepatocyte. The objective of this work is the amplification and isolation of the glycoproteins

of the viral envelope of all virus genotypes, from genotype 1 to 6, to the afterwards and *in vitro* evaluation of the anchoring capacity of this (HCVpp) to LDLR expressed in hepatic cells, in order to determinate the importance of LDLR in HCV liver entry and determinate the effect of the different viral genotypes in the capacity and necessity to connect with this receptor. The results of this study has been the amplification and the clonation of the viral envelope glycoproteins of genotype 3, without become building the (HCVpp).

Key Words: LDLR, HCV, HCVpp.

Estructura del HCV.

El virus de la hepatitis C (HCV) es un virus cuyo genoma está constituido por una hebra única y positiva de ácido ribonucleico(ARN) [6], que a diferencia del ARNm de los organismos eucariotas carece de caperuza de metilguanosa en el extremo 5' y de cola de poliadenina en el extremo 3' [1]. Esta hebra contiene aproximadamente 9400 bases nitrogenadas y un marco de lectura abierto o Open Reading Frame(ORF) que le permite codificar una poliproteína de entre 3.010-3.011 aminoácidos[4]. Esta poliproteína, codificada por el ácido ribonucleico que constituye el virus, presenta una gran homología con las poliproteínas codificadas por los flavivirus y pestivirus, los cuales se encuentran clasificados dentro de la familia *Flaviviridae*. Sin embargo, la divergencia en la secuencia y la presunta estructura de la proteína sugieren que el HCV representa un nuevo tipo de virus que debe de constituir un nuevo miembro de esta familia [4] por lo cual el HCV se encuentra clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* [5]. Los miembros de la familia *Flaviviridae* comparten una serie de características básicas, tanto estructurales como virológicas[7]. Estos virus se caracterizan por encontrarse rodeados por una doble membrana lipídica, en la cual, se localiza ancladas dos o más proteínas de membrana(E). Esta doble cubierta lipídica rodea a la nucleocápsida, formada por la unión de múltiples copias de una pequeña proteína denominada (Core o C). La nucleocápsida a su vez rodea el genoma del virus(ARNmc positivo) [7]. La región ORF del virus es capaz de codificar una poliproteína que contiene información para la síntesis tanto de proteínas estructurales, que constituyen la configuración del virus, como de proteínas no estructurales, las cuales, desempeñan un papel fundamental en la replicación y el ciclo de vida del virus.

Las proteínas estructurales se encuentran codificadas en la región N-Terminal de la región ORF, mientras que las proteínas no estructurales se encuentran codificadas en la región C-Terminal. Esta región ORF a su vez se encuentra flanqueada por dos regiones UTR en el

extremo 5' y 3', las cuales, juegan un importante papel en la traducción de la poliproteína y en la replicación del virus [7]. La región 5' UTR que franquea la región ORF está constituida por 341 nucleótidos situados aguas arriba del inicio de la transcripción de dicha región, la región 5' UTR del virus presenta cuatro dominios altamente estructurados numerados desde el I al IV, los cuales, presentan numerosos bucles y pseudonudos [7]. Además esta región presenta un sitio interno de entrada al ribosoma(IRES), el cual es fundamental para la traducción de la poliproteína[1]. La importancia de las IRES en la traducción de la poliproteína vírica radica en su capacidad de formar un complejo de pre-iniciación, que directamente se une a la subunidad pequeña del ribosoma sin la necesidad de que se produzca la intervención de los factores iniciadores de la traducción. La región 3' UTR presenta aproximadamente 225 nucleótidos y se encuentra organizada o dividida en tres regiones, la cuales en dirección 5'-3'son: Una región variable de aproximadamente 30-40 nucleótidos, una larga cola de poliuracilo seguida de una cola poli(U/UC) y una región 3' terminal constituida por 98 nucleótidos denominada (región 3' X), esta presenta tres estructuras con forma de bucle denominadas SL1, SL2 Y SL3. Esta región interacciona con la región de la poliproteína que codifica a la proteína no estructural NS5B [7].Se ha observado que tanto la región 3' X como los 52 nucleótidos situados aguas arriba de la cola de poli U/C de la región 3' UTR desempeñan un papel fundamental en el proceso de replicación del ARN vírico. Por lo que esta región parece mejorar la replicación del genoma viral[7]. De acuerdo a estudios recientes parece ser que la replicación del ARN genómico del HCV se produce en el interior de los complejos RNP, los cuales se encuentran ensamblados en la superficie de estructuras membranosas derivadas del retículo endoplasmático[1].

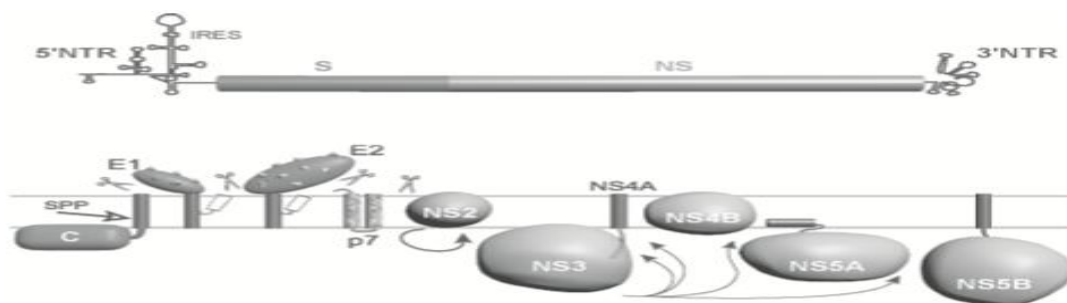


Figura.1: Estructura del genoma del virus, dividida en una región S (estructural), la cual, codifica proteínas estructurales del virus y NS (no estructural), la cual, codifica proteínas no estructurales y proteínas codificadas por el virus (E1,E2,p7,NS2,NS3,NS4A, NS4B,NS5A,NS5B), y las regiones 3' UTR y 5' UTR, la cual, contiene la región (IRES) [7].

La región ORF codifica al menos 11 proteínas conocidas. 3 proteínas estructurales, 6 proteínas no estructurales y una proteína denominada proteína F, que da lugar a un fenómeno de Frameshift o cambio de marco de lectura en la región codificante de la proteína C o Core [7]. Una vez que se ha producido la traducción de la poliproteína esta es procesada por las peptidasas de la célula huésped y las proteasas virales dando lugar a proteínas estructurales (proteína C, E1 y E2) y proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B). Se ha observado que una vez se han sintetizado las proteínas no estructurales, estas se asocian rápidamente a la membrana del retículo endoplasmático[1].

En los últimos años se han llevado a cabo una gran cantidad de trabajos y de estudios para aclarar la función de cada una de estas proteínas. Hoy día se conoce la función de la mayoría de ellas dentro del ciclo vital del virus.

Proteínas estructurales.

Proteína C o proteína Core: La proteína C del HCV es una proteína altamente conservada y muy básica, la cual es liberada de la poliproteína debido a la presencia de una señal para peptidasas en el extremo C-terminal[8]. Se trata de una ligasa de ARN de estructura dimerica y alfa helicoidal [8] que forma la nucleocápsida del virus. Esta proteína está constituida por 191 aminoácidos y tres dominios distintos predichos: Un dominio hidrofílico de unos 120 aminoácidos situado en el extremo N- terminal (dominio D1), un dominio hidrofóbico de unos 20 aminoácidos situado en el extremo C-Terminal (dominio D2) y los 20 últimos aminoácidos que sirven de señal para las peptidasas aguas abajo de la proteína de la envuelta E1. Se la ha localizado asociada a gotas lipídicas citoplasmáticas, en células infectadas por HCV[8]. Además de su rol en la formación de la nucleocápsida, también regula el tráfico entre el RE y la localización de formación de las nucleocápsida mediante una señal para peptidasa en su extremo C-Terminal[8]. También se le ha sugerido una participación en gran cantidad de rutas proteicas, las cuales pueden ser importantes en el ciclo viral del virus[7].

Glicoproteínas de la envuelta (E1 Y E2): Estas proteínas son componentes fundamentales de la envuelta de los viriones del HCV[7] y necesarios para la entrada y fusión del virus [9]. Tanto E1 como E2 son proteínas transmembrana de unos 33-35 y 70-75 kDa respectivamente, las cuales se organizan como heterodímeros, unidos mediante interacciones no covalentes. Presentan numerosas funciones, siendo la más importante su función de anclaje a membranas celulares[8]. E2 presenta una región hipervariable, denominada HVR1, la cual, presenta una secuencia de aminoácido que difiere en un 80% entre los diferentes genotipos del virus. A

pesar de esta divergencia, esta región presenta una conformación muy conservada entre los diferentes genotipos del virus, pudiendo presentar una función fundamental en el ciclo de vida del virus. También se ha identificado otra región hipervariable en E2 denominada HRV2, la cual se postula como un modulador de unión a receptor [8]. E2 desempeña un papel fundamental en las etapas tempranas de la infección. Diversos estudios hacen pensar que es fundamental en el inicio del acoplamiento del virus, mediante su interacción con receptores de membrana. HVR1 es una región la cual, se postula cargada de residuos, pudiendo interactuar con moléculas de membrana pobres en estos residuos, pudiendo jugar un papel imprescindible en el reconocimiento endógeno de las células del huésped. De la proteína E1 se tiene mucha menos información, se cree que presenta una función en la fusión intracitoplasmática de la membrana del virus. [7].

Proteína F o ARFP: HCV presenta una zona de solapamiento en la secuencia que codifica a la proteína Core. En esta zona solapante puede producirse un marco de lectura alternativo (ARF) el cual suele omitir el codón inicial AUG, pudiendo tener un determinado efecto en el proceso de traducción. La proteína F es generada como resultado de un proceso de frameshift o cambio del marco de lectura en la región N-Terminal de la región codificante de la proteína C [7]. La función de esta proteína en el ciclo de vida del virus todavía no está clara. Puede ser responsable de varios de los efectos atribuidos a la proteína core [8] ya que puede producir frameshift en la región que la codifica, también se ha propuesto su participación en procesos de resistencia o persistencia viral.

Proteínas no estructurales.

p7: El polipéptido que constituye la proteína p7 es pequeño, de unos 63 aminoácidos[7] y se encuentra en el interior de la poliproteína, más concretamente en la zona de unión entre las proteínas estructurales y las no estructurales, es liberada de la poliproteína gracias a la presencia de una señal endógena para peptidasas. La proteína p7 es una pequeña proteína de membrana constituida por dominios transmembrana cuyos extremos N y C terminales se encuentran orientados hacia el retículo endoplasmático [8]. La morfología de esta proteína, con residuos a ambos lados de la membrana sugiere su función estructural en membranas. Estudios recientes han localizado esta proteína no solo en la membrana del retículo endoplasmático sino también en la membrana mitocondrial y un bajo porcentaje en la membrana plasmática. Parece ser que esta proteína no es necesaria para la replicación del genoma vírico y no se sabe con certeza si forma parte de la estructura del virión. Se ha

observado que esta proteína presenta un canal iónico y que es esencial para la capacidad infectiva del virus en chimpancés [8].

NS2: Se trata de una proteína de membrana de entre 21-23 kDa, la cual no parece participar en la formación del complejo de replicación de HCV [7]. No se sabe con certeza cuál es el papel que la forma madura de la proteína desempeña en el ciclo de vida de HCV, sin embargo, antes de ser liberada de la poliproteína, participa en la rotura de la unión NS2-NS3, siendo necesarios los 180 primeros residuos de la proteína NS3[8]. Esta proteína ha sido localizada en la membrana del retículo endoplasmático. Parece estar implicada en el proceso de ensamblaje y liberación del virus[8]. Se ha observado que NS2 puede interactuar con proteínas celulares como (CIDE-B) y afectar a la expresión de determinados genes controlados por promotores y potenciadores específicos del hígado y no específicos del mismo [7].

NS3-NS4A: NS3 es una proteína vírica multifuncional, la cual presenta en su extremo N-Terminal un dominio Serina proteasa y en su extremo C-Terminal un dominio helicasa/NTasa. Parece ser que NS4A es una proteína que actúa como cofactor de NS3. El complejo NS3-4A parece mostrar propiedades adicionales y parece intervenir en rutas celulares y proteicas, las cuales pueden ser fundamentales en ciclo de vida y la patogénesis de la infección. El dominio con actividad proteasa también denominado NS3-NS4 proteasa es fundamental para el desarrollo del ciclo de vida del virus ya que se encarga de la rotura de las uniones NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/ NS5B de la poliproteína. El papel de la proteína NS4 es permitir la estabilización y la localización del complejo proteico en la membrana del retículo endoplasmático, así como la liberación dependiente de activación de la unión NS4B/NS5A. Por otra parte el dominio helicasa-NTPasa, está constituido por 442 aminoácidos a partir del extremo C- Terminal y se le ha asociado con otras funciones de vital importancia para el ciclo vital del virus como su actividad NTPasa, unión a ARN y su capacidad de desenrollar determinadas regiones de la estructura secundaria del ARN previa hidrólisis de NTP [7].

Esta región también parece presentar una importante función durante la replicación del ARN viral. Diversos estudios evidencian que el dominio helicasa-NTPasa de la proteína NS3 podría producir translocaciones durante la replicación produciendo cambios en la conformación de la proteína [7].

NS4B: Es una proteína de membrana altamente hidrofóbica [8] constituida por 261 aminoácidos [7]. Se cree que presenta 4 dominios transmembrana [8] y una alfa hélice anfipática [7]. Tanto su extremo N-Terminal como su extremo C-Terminal han sido encontrados en el citosol, sin embargo, una elevada fracción también ha sido encontrada en el lumen del retículo endoplásmico y en su membrana, por lo cual, se le considera una proteína asociada a este orgánulo celular. Su función parece estar asociada a su localización ya que parece mediar la comunicación cruzada entre el retículo endoplasmático y el citosol [8] asimismo, parece ser que también desempeña un papel fundamental en la replicación del virus, sirviendo como ancla del complejo de replicación a la membrana del retículo endoplasmático [7].

NS5A: Esta proteína no estructural parece ser fundamental para la replicación del virus. Se trata de una proteína de unos 56-58 kDa [7] que presenta una hélice alfa en su extremo N-terminal, la cual parece ser fundamental para su anclaje a las membranas, ya que al igual que otras proteínas no estructurales del virus se trata de una proteína transmembrana asociada en gran medida al retículo endoplasmático[8]. Presenta tres dominios, I, II y III [7]. Los dos primeros dominios se encuentran separados por secuencias de baja complejidad, también conocidas como Low Complexity Sequences (LCs) [8]. El dominio I a su vez se encuentra dividido en dos subdominios, un subdominio IA, el cual se encuentra en el extremo N-Terminal y un subdominio IB, el cual se encuentra en el extremo C-Terminal, parece ser que la principal función del dominio I de esta proteína transmembrana es la formación de homodimeros, a través de su extremo N-Terminal[8]. Parece ser que la finalidad de la formación de estos homodimeros es la formación de una muesca o marca de carácter básico que se cree proporciona un dominio de unión a ARN que puede estar involucrado en la regulación del genoma vírico, regulando la formación del complejo de replicación. La función del dominio II no está totalmente determinada, siendo necesario un estudio en mayor profundidad para determinarla, sin embargo, diversos estudios sugieren su implicación en la resistencia al interferón [8] mediante su unión e inhibición de la PKR inducida por el mismo interferón [7]. Tanto la estructura como la función del dominio III son altamente desconocidas hasta ahora. Se ha observado la unión de la proteína NS5A al ARN de HCV, presentando preferencia en su unión por la región 3' del mismo.[8] Se sabe que esta proteína es fundamental para la replicación del genoma viral, ya que mutaciones en ella suponen una inhibición parcial o incluso total del genoma viral [7]. También se ha observado que su fosforilación es fundamental para el paso de replicación viral a ensamblaje [7] y que

interacciona con la proteína NS5B aunque todavía no se tiene información sobre el mecanismo por el cual ambas proteínas interactúan ni cuál es la función de esta interacción en el ciclo vital del virus [8].

NS5B: Se trata de una proteína transmembrana, que al igual que otras proteínas virales se encuentra asociada a la membrana del retículo endoplásmico. En cuanto a su estructura, su región C-Terminal presenta una alfa hélice transmembrana constituida por 21 residuos de aminoácidos cuya función parece ser mediar la dirección post-translacional hacia cara citosólica del retículo endoplásmico[7]. En cuanto a su función, se trata de una polimerasa de ARN dependiente de ARN, la cual se encarga de replicar el genoma viral, siendo un componente fundamental en el proceso de replicación vírica.[8] Presenta una estructura similar a la de otras polimerasas virales con la peculiaridad de que la enzima experimenta o da lugar a una estructura redondeada siendo en su totalidad un centro activo, esto presenta la finalidad de potenciar la interacción entre sus distintas subunidades creando una especie de ``túnel`` por el cual la molécula de ARNmc es guiada hasta el centro activo. Su actividad polimerasa parece estar modulada por su interacción con otras proteínas víricas no estructurales como NS3 y NS5B [7]. Debido a la importancia que presentan tanto NS5A como NS5B en la replicación del genoma de HCV como en la formación del complejo de replicación ambas proteínas están siendo propuestas y utilizadas como diana de antivirales, con la finalidad de tratar las infecciones ocasionadas con dicho virus [7]. El virus de la hepatitis C (HCV) presenta 6 genotipos diferentes (1A,1B,2,3,4 y 5) [7] y más de 50 subtipos, lo cual muestra su enorme variedad y su capacidad de mutación y adaptación que han hecho que se haya distribuido por todo el mundo.

Epidemiología de HCV.

De acuerdo a la organización mundial de la salud (OMS) aproximadamente un 3% de la población mundial, es decir, unas 170 millones de personas, se encuentran infectadas por el virus de la hepatitis C produciéndose entre 3 y 4 millones de infecciones nuevas cada año [11]. La infección causada por HCV o Hepatitis C es una enfermedad que puede llegar a ser crónica y dar lugar a una gran cantidad de alteraciones graves como esteatosis, fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular [1]. La Hepatitis C es uno de los principales problemas que afecta a salud pública de una gran cantidad de países a lo largo del mundo [13]. La distribución y la prevalencia de HCV ha sido descrita detalladamente en [10] y [11]. Los genotipos predominantes en España así como su prevalencia en España han sido estudiados

en [13], [10] y [12], siendo los genotipos 1b y 3 los genotipos de HCV predominantes en España.

Efectos patológicos del HCV. Efectos metabólicos.

Como ya se ha reflejado anteriormente el virus de la hepatitis C(HCV) es un patógeno que ha desarrollado mecanismos los cuales les permite infectar el organismo de manera exitosa[16]. Su gran éxito como patógeno radica en la capacidad que presenta el virus de utilizar el metabolismo interno del huésped para producir nuevas partículas virales, de esta manera el virus favorece su supervivencia. La capacidad que tiene el virus de utilizar y modificar el metabolismo del huésped induce a que se produzcan enfermedades de carácter crónico y el desarrollo de determinados cambios estructurales o anatómicos en el organismo infectado[5]. Estos cambios anatómicos son principalmente: Esteatosis hepática, fibrosis, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular [1].

El virus de la hepatitis C(HCV) lleva a cabo una marcada modificación del metabolismo lipídico del organismo huésped o infectado, la cual le permite formar nuevas partículas virales y por tanto su perduración en el organismo. HCV influye el metabolismo lipídico del huésped en tres niveles. 1-Aumenta la síntesis *de novo* de lipoproteínas, sobre todo a nivel hepático, 2- Disminuye la degradación lipídica y 3- Perjudica el mecanismo de exportación de lípidos. Estos tres niveles de modificación en el metabolismo lipídico del individuo van a favorecer la acumulación de lípidos, sobre todo a nivel hepático, fenómeno de carácter fundamental para el desarrollo del ciclo de vida del virus [1]. Estas alteraciones en el metabolismo lipídico, se producen durante la infección de HCV, considerándose los fundamentos patológicos de una gran cantidad de enfermedades causadas por HCV. Como ya se ha mencionado, las manifestaciones más comunes, las cuales son producidas por una modificación del metabolismo lipídico de huésped son esteatosis y carcinoma hepatocelular además de resistencia a la insulina y obesidad. También se puede observar una modificación de los perfiles séricos de lípidos en individuos afectados. Todas estas modificaciones producen una alteración de la homeostasis lipídica de organismo, la cual perjudica en gran medida al paciente, en contra del virus el cual se ve beneficiado [1].

Síndrome dismetabólico asociado a hepatitis C.

La infección por hepatitis C está asociada con una gran cantidad de desajustes metabólicos y esteatosis. De forma colectiva, a este conjunto de efectos o síntomas se les denomina

síndrome dismetabólico asociado a hepatitis C, cuyas siglas en inglés son (HCADS). Estos desequilibrios metabólicos son la resistencia a insulina además de muchos otros como, hipocolesterolemia y una alteración de la distribución corporal del depósito de lípidos. Se necesitan más datos para determinar el impacto de estos desajustes en el ciclo de vida del virus, sin embargo se ha observado que en pacientes con estos síntomas, la capacidad de supervivencia del virus es mayor [15].

Esteatosis: La esteatosis es una modificación estructural que se produce durante la infección por HCV. Esta modificación anatómica consiste en la acumulación hepatocelular de gotas lipídicas. Puede observarse tanto en desordenes hepáticos como extra-hepáticos, como la obesidad o el síndrome metabólico. La prevalencia de esteatosis en pacientes con hepatitis C crónica es bastante elevada. Es uno de los síntomas histológicos más notorio de la infección causada por hepatitis C [1]. Se produce en un 73% de los pacientes infectados por el genotipo 3 del virus y en 50% de los pacientes infectados por los genotipos restantes de virus, siendo el genotipo 3 del virus el más patogénico. Esta modificación estructural parece producirse como consecuencia de la expresión de la proteína viral o proteína C en infecciones causadas por el genotipo 3, sin embargo parece estar asociado con desordenes metabólicos cuando la infección es causada por uno de los genotipos restantes[3]. Se ha observado que la proteína C de genotipo 3 produce una reducción de la regulación ejercida por PTEN.

Resistencia a Insulina: Diversos estudios evidencian la relación entre la infección causada por HCV y el desarrollo de resistencia a la insulina. Estudios llevados a cabo en ratones transgénicos han demostrado que la proteína C o Core del HCV induce el desarrollo de resistencia a la acción de la insulina y que está a su vez induce la aparición de esteatosis. Por ello HCV es actualmente considerado como un virus diabetogénico en individuos que presentan predisposición. La presencia d HCV parece aumentar en gran medida el riesgo de padecer diabetes tipo 2. Parece ser que este aumento del riesgo de padecer diabetes tipo 2 se debe a la infección en sí, independientemente de que se produzca un daño hepático de carácter crónico [15]. Otros estudios han determinado que pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus de la hepatitis C (HIV-HCV) presentan un mayor riesgo de padecer diabetes tipo dos que pacientes, los cuales únicamente se encuentran infectados por HIV, ratificando el efecto inductivo que presenta el virus sobre la aparición de resistencia a la Insulina [15].

Hipocolesterolemia y hipertensión arterial: Diversos estudios han encontrado menores niveles séricos de colesterol en pacientes con hepatitis C crónica que en pacientes con NAFLD y individuos sanos. También se ha observado que pacientes, con hepatitis C crónica que presentan una respuesta adecuada al tratamiento con interferón, se produce una normalización de los niveles de colesterol en sangre. Estos descubrimientos sugieren que HCV es capaz de modificar determinadas rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de colesterol [16]. Parece ser que esta modificación presenta una gran importancia para el ciclo de vida del virus, ya que los lípidos y en concreto el colesterol son un componente fundamental de la estructura del virión. Esta hipocolesterolemia asociada al virus, parece estar causada por la inhibición de la secreción de apoB100 [15].

Distribución lipídica alterada: Parece ser que HCV no solo es capaz de replicarse en el tejido hepático, sino que también es capaz de hacerlo en otros tejidos. Estudios recientes sugieren que el virus podría interaccionar además de con el tejido hepático, con el tejido adiposo, pudiéndose producir también replicación del virus en él. Existen varios fenómenos que evidencian la posible interacción entre el tejido adiposo y el virus. Se ha observado que pacientes infectados de HCV presentan una grasa mesentérica, es decir, peritoneal más densa que la de individuos sanos que nunca han sufrido infección, aunque no se ha probado la colonización de este mesenquima por parte del virus, parece ser que hay una interacción de este con el tejido adiposo peritoneal.

Hiperuricemia: La hiperuricemia se define como una concentración de ácido úrico en sangre superior a 7 mg/dL en hombres y 6mg/dL en mujeres respectivamente. Un estudio llevado a cabo con 496 pacientes con hepatitis C crónica determinó que un 7.5% de estos presentaban hiperuricemia.

Hipertensión: Estudios han determinado también una relación entre la presencia del virus y la presencia de hipertensión.

Alteraciones del metabolismo lipídico.

HCV parece modular la homeostasis lipídica mediante un aumento de la lipogénesis y una reducción de la exportación y la oxidación lipídica[15].

Aumento de la *de novo* lipogénesis: Es conocido que la infección producida por HCV produce un aumento de la síntesis lipídica. Parece ser que este aumento se produce debido a que el virus es capaz de sobreexpresar determinados genes, los cuales participan en la síntesis de

novo de ácidos grasos y en su absorción[16]. Esta sobreexpresión causada por HCV parece estar mediada por SRBEP, un factor de transcripción, que se encuentra localizado fundamentalmente en la membrana del retículo endoplasmático, a la cual se encuentra asociada. SRBEP presenta 3 isoformas, SRBEP-1a, SRBEP-1c y SRBEP-2. SRBEP-1a se encarga de la regulación de aquellos genes regulados de forma habitual por SRBEP, SRBEP-1c y SRBEP-2 se encargan de activar genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos y de colesterol. También se ha observado que (FAS), una enzima encargada de sintetizar ácidos grasos, se encuentra sobreactivada durante la infección de HCV[1].

Reducción de la oxidación lipídica o β -oxidación: Se ha observado que esta reducción es producida por la proteína C o proteína Core de la proteína, la cual perturba la función mitocondrial. Parece ser que la proteína C también produce un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS), esto ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta disminución de la actividad oxidativa también ha sido reportada por estudios, los cuales se han centrado en determinar cambios en la concentración total de cuerpos cetónicos (una medida indirecta de la reducción de la oxidación de sustratos lipídicos), siendo significativamente menor en pacientes con hepatitis C con respecto a individuos sanos[15]. La base molecular de esta disminución parece encontrarse en un receptor nuclear presente en células hepáticas PPAR-alfa. Este receptor estimula la oxidación de ácidos grasos, estimulando su entrada en la mitocondria. Parece ser que HCV produce una disminución de su actividad, favoreciendo la deposición de acúmulos de grasa y perturbando la entrada de ácidos grasos a la mitocondria[9]. El genotipo 3 del virus parece ejercer una acción más contundente sobre PPAR-alfa que el genotipo 1.

Reducción de la exportación de sustratos lipídicos desde los hepatocitos al torrente sanguíneo: HCV es capaz de llevar a cabo este proceso gracias a una de sus proteínas no estructurales, la proteína 5A, la cual es capaz de interaccionar con la apo B-100 sintetizada en el hígado e inhibir su secreción, inhibiendo así la secreción de de aquellas lipoproteínas que presenten apo B-100 como HDL y VLDL[15].

Alteraciones en el metabolismo de Lipoproteínas.

Existen evidencias de que la infección por HCV no solo produce una perturbación del metabolismo lipídico en los hepatocitos del individuo infectado sino que también produce una alteración en el metabolismo de las lipoproteínas [4]. HCV puede secuestrar elementos implicados en la ruta de secreción de las VLDL para la formación de partículas lipovirales

(LVP) que pueden circular por el individuo afectado. Sin embargo, las partículas víricas no solamente se encuentran asociadas a lipoproteínas hepáticas dotadas de apo B-100, sino que también se les ha asociado con lipoproteínas de localización exclusivamente intestinal, los quilomicrones, los cuales presentan una Isoforma exclusiva de apoproteína, la apo B-48. La presencia de esta subpoblación de LPV indica un intercambio activo entre los viriones y las lipoproteínas. También se han encontrado en pacientes afectados por HCV lipoproteínas carentes de nucleocápsida que presentan en su superficie proteínas de la envuelta del virus, a estas se les ha denominado partículas lipovirales vacías (eLVP), aunque no presentan nucleocápsida parece ser que favorecen la fisiopatología del virus [14].

La LPV son ricas en triglicéridos apo B-100 y apo E, presentan gran similitud fisicoquímica con las VLDL ya que se forman a partir de elementos implicados en su síntesis. Modelos in vitro de infección por HCV han determinado una menor capacidad infectiva de los viriones intracelulares inmaduros con respecto a los viriones liberados, los cuales presentan una gran capacidad infectiva, estos estudios sugieren que el ensamblaje intracelular de los viriones para formar las (LVPs) aumenta la capacidad infectiva del virus [1].

Todavía no se sabe de manera concreta cuáles son las ventajas que le aportan al virus su ensamblaje a las lipoproteínas, las cuales le permiten presentar una mayor capacidad infectiva. Diversos estudios sugieren que esta asociación favorece la unión del virus con receptores de lipoproteínas y por tanto su entrada en determinados tejidos diana como el hígado, también parece dificultar el su reconocimiento por parte del sistema inmunitario, protegiéndolo de este [14].

Como ya se ha mencionado la lipoproteína VLDL, es fundamental para la formación de y secreción de las (LVPs), aunque también se ha observado que desempeña muy importante en el proceso de maduración del virus. El mecanismo por el cual HCV se asocia las partículas de VLDL no está todavía claro aunque se cree que se produce en el retículo endoplásmico y que es fundamental la participación de la transferasa microsomal de triglicéridos (MTP), lo que si se conoce es que su asociación requiere de un ambiente rico en lípidos y que es necesario la asociación de la proteína Core del virus y las LDs para que se produzca la formación de las LVPs [14].

Entrada del virus en el hígado.

Una vez que se produce la entrada o invasión del virus al interior del organismo, la entrada del virus al tejido hepático constituye la primera etapa de la infección viral y de la replicación del virus. La entrada del HCV al interior de los hepatocitos es un proceso complejo, muy coordinado y secuencial, en el cual, se encuentran involucradas una gran cantidad de moléculas de superficie presentes en la membrana externa de los hepatocitos [16].

La entrada del virus puede dividirse en tres etapas: 1- Acoplamiento a la membrana del hepatocito 2- Unión a receptores mediadores de endocitosis de partículas virales 3- Endocitosis. Las partículas de HCV circulante suelen presentar una densidad de entre 1.03 y 1.34 g/ml. Las partículas virales de HCV constituyen una población muy heterogénea, no solo desde el punto de vista genético, sino también fisicoquímicamente. Esta variabilidad fisicoquímica se deba a la capacidad que presentan las partículas víricas de unirse a inmunoglobulinas y lipoproteínas[9]. Por lo que además de encontrarnos en plasma partículas víricas libres del virus, también podemos encontrarlas unidas a lipoproteínas, constituyendo unas estructuras denominada lipoviropartículas, las cuales se caracterizan por presentar moléculas características de las lipoproteínas, como ApoE, ApoB y estructuras víricas, el genoma viral y la protein C o Core. Esta heterogeneidad estructural también va a determinar una heterogeneidad con respecto a los mecanismos de entrada del virus al interior del tejido hepático.

In vivo HCV es capaz de entrar en el hígado a través de la sangre sinovial. Tanto las células endoteliales de los capilares sinoviales como las células de Kupffer, expresan en su superficie dos moléculas que son capaces de unirse con gran afinidad a la proteína E2 del virus, (L-SIGN) y (DC-SIGN). Esta capacidad de unión sugiere que ambas moléculas de superficie podrían capturar partículas de HCV y transmitirlas hacia los hepatocitos donde gracias a su interacción con una gran cantidad de moléculas de su superficie son capaces de penetrar en su interior y producir la infección [16]. Por lo tanto ambas juegan un papel muy importante en el ciclo de vida del virus siendo críticas en la patogénesis y el tropismo tisular [7].

Una vez que las partículas virales han logrado atravesar el endotelio sinovial, estas pueden ponerse en contacto con la membrana basal de los hepatocitos. GAGs y LDLR parecen contribuir a la concentración de las partículas virales en la superficie celular del hepatocito ya que se han sugerido como puntos de anclaje inicial del virus [16].

Después de producirse un acoplamiento inicial a la superficie de los hepatocitos el virus lleva a cabo una serie de interacciones con co-receptores y otras moléculas que actúan como factores de entrada específicos produciendo una modificación estructural de la membrana plasmática, la cual le permite su internalización en el hepatocito [16]. Varias moléculas presentes en la superficie de los hepatocitos han sido propuestas como candidatas a actuar como receptores y mediadores de la entrada de HCV al interior celular, basándose en su capacidad de asociarse con los viriones o con la proteína E2 de las partículas solubles del virus [17]. Durante los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de modelos para identificar receptores candidatos que presenten la capacidad de unirse al HCV y estudiar los mecanismos tanto de unión como de entrada del virus al interior de los hepatocitos. Estos modelos consisten en modelos *in vivo*, en los cuales se utilizan o bien muestras de sangre infectada procedente de pacientes enfermos o bien partículas similares al virus, producidas mediante la expresión de proteínas estructurales del virus en células procedentes de mamíferos o en insectos, también se han empleado lisosomas que contienen E1-E2 y pseudopartículas virales [7].

Receptores HCV.

Como se ha mencionado con anterioridad existen varias moléculas superficiales que han sido propuestas como mediadores de la unión o bien de la internalización del virus en los hepatocitos.

SR-B1 y CD81: El receptor Scavenger tipo I es una glicoproteína de membrana que presenta un largo dominio extracelular anclado en la membrana plasmática y ambos extremos de la proteína, tanto el N-terminal como el C-terminal constituyen el dominio transmembrana, el cual presenta una pequeña extensión citoplasmática [7]. SR-B1 se expresa en gran medida en el hígado y en los tejidos esteroideogénicos como las gónadas y los riñones. Es capaz de unirse a una gran cantidad de lipoproteínas incluyendo (HDL), (LDL) y (LDL) oxidadas y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo lipídico ya que media la entrada selectiva de HDL hacia el interior de los hepatocitos [16]. Se ha determinado que SR-B1 es capaz de unirse directamente a la región hipervariable HRV1 de la glicoproteína E2 del virus y de interactuar con virus asociados a lipoproteínas [17]. Estudios recientes sugieren que el virus utiliza el SR-B1 a modo de colector. Inicialmente la unión de las partículas de HCV al receptor es independiente de E2, esta parece estar mediada en gran parte por componentes lipoproteicos, sobre todo ApoE, por lo que las principales funciones de SR-B1 en la internalización del virus son el anclaje de ApoE, la transferencia lipídica y la

interacción con la glicoproteína vírica E2[9]. Una vez que se produce la unión la capacidad de transferencia de lípidos del receptor puede facilitar la entrada de las partículas a la siguiente etapa, permitiendo su exposición a la región de reconocimiento de E2 del receptor CD81 [17].

CD81 es miembro de la superfamilia de la tetraspaninas, se caracteriza por presentar cuatro dominios transmembrana, un motivo CCG y una región extracelular (LEL), la cual está constituida por cinco hélices alfa y se caracteriza por presentar cuatro residuos de cisteína, los cuales se agrupan formando dos puentes disulfuro que estabilizan el dominio [7]. Se ha determinado que CD81 interacciona con la glicoproteína E2 a través de su región extracelular (LEL), más concretamente a partir una serie de residuos de aminoácidos de disposición discontinua presentes en este dominio. Diversos estudios sugieren que CD81 es un co-receptor post-acoplamiento, la interacción entre el virus y CD81 parece inducir una serie de cambios conformacionales de las glicoproteínas E1 y E2, los cuales parecen facilitar la fusión pH-dependiente y la endocitosis del virus.

CLDN1: Tras unirse a CD81 las partículas virales interaccionan con unas proteínas pertenecientes a la familia de las claudinas como CLDN6 y CLDN9, sin embargo es CLDN1 con la cual las partículas virales se asocian en mayor medida ya que las dos proteínas anteriores se expresan a bajos niveles en el hígado [16]. Estas proteínas están constituidas por dos dominios extracelulares, uno largo y otro pequeño, denominados (EL1 y EL2) respectivamente y cuatro dominios transmembrana. La unión con HCV se produce a través del dominio extracelular, más concretamente a partir del dominio EL1. Las actuaciones tanto de CD81 como de CLDN1 se producen de forma muy cercana en el tiempo durante la entrada de HCV, también se ha observado una interacción entre CD81 y CLDN1 [16]. Ambos sucesos sugieren que los dos receptores forman un complejo que facilitan la entrada del virus durante su invasión a los hepatocitos. CLDN1 no interacciona directamente con las glicoproteínas del virus sino que actúa asociándose con CD81, jugando así un papel muy importante en las etapas post-anclaje de la entrada del virus en el hígado. CLDN1 se expresa tanto en la membrana apical como en la basolateral, sin embargo se ha observado la ausencia de complejos CD81 y CLDN1 en las *tight junctions* de la membrana apical, lo cual sugiere que el virus se une a los complejos CD81 y CLDN1 de la membrana basolateral para llevar a cabo su internalización [16]. Recientemente se ha descubierto la participación fundamental de un receptor tirosina quinasa en la formación de los complejos CD81 y CLDN1 y por tanto en la internalización del virus. Este receptor tirosina quinasa es el EGFR, el cual regula una gran cantidad de procesos celulares como la proliferación y la diferenciación celular.

OCN Y TfR1: OCN es una proteína perteneciente a la familia de las junction proteins, constituida por cuatro dominios transmembrana, dos dominios extracelulares y sus extremos N-terminal y C- terminal constituyen la región intracitoplasmática. OCN ha sido identificado como un co-receptor necesario para la entrada de HCV al interior de los hepatocitos, más concretamente es requerido en etapas post-anclaje de la entrada del virus [16]. OCN al igual que otros co-receptores utilizados por el virus para su entrada en el hígado, es capaz de unirse mediante su segundo dominio extracelular a la glicoproteína E2 de HCV. TfR1 es una proteína de membrana muy ubicua, es decir, se encuentra expresada en casi todos los tejidos del organismo y su función es mediar la entrada de hierro al interior de los tejidos vía clatrina- endocitosis, este receptor parece mediar la entrada de HCV a través de su interacción con sus glicoproteínas y se ha determinado que su actuación es posterior a CD81.

NPCL1: Es el co-receptor implicado en la entrada de HCV en el hígado más recientemente encontrado. Este receptor se expresa de manera fundamental en la cara apical de los enterocitos intestinales y en la membrana de los hepatocitos situados en los canalículos biliares. Su función es mediar la internalización de colesterol. Probablemente esta actividad esté involucrada en la internalización de HCV [16].

Endocitosis de HCV.

Después del anclaje del virus a la membrana del hepatocito se produce un proceso de fusión, en el cual se fusionan la membrana celular y la membrana viral, cuyo resultado es la entrada de la nucleocápsida del virus al citoplasma de la célula [7] y la liberación del genoma del virus para así continuar con su ciclo de vida [16]. La fusión es mediada por proteínas especializadas del virus, las cuales actúan tanto en la membrana plasmática produciendo una reestructuración molecular [17] o después de producirse la internalización de la partícula, en el endosoma [7]. La entrada del virus está controlada por las glicoproteínas virales, las cuales disparan la producción de los cambios necesarios para su fusión[17]. En la familia *Flaviviridae* pueden distinguirse dos tipos de proteínas de fusión (proteínas de fusión I y proteínas de fusión II) , las glicoproteínas de HCV, las cuales median la entrada del virus, parecen pertenecer a la clase II de este tipo de proteínas[7]. La internalización del virus es pH-dependiente [7] se produce a través de vesículas endosómicas acidificadas, en el interior de las cuales los viriones son movilizados. Parece ser que un ambiente ácido favorece la consecución de una serie de cambios estructurales que disparan la acción de las glicoproteínas

virales como mediadoras de la entrada del virus. Como ya se ha mencionado la entrada de HCV es dependiente de endocitosis, más concretamente de endocitosis mediada por clatrina y dinamina, en este proceso endocítico resulta fundamental el complejo CD81-CLDN1.

Papel de LDLR en la entrada de HCV en el hígado.

LDLR es un receptor muy abundante en el tejido hepático ya que es fundamental en la regulación del metabolismo lipídico y lipoproteico, función que lleva a cabo de manera fundamental el hígado. The low-density lipoprotein receptor (LDLR) es un receptor endocítico capaz de transportar lipoproteínas, fundamentalmente LDL, al interior de las células mediante su interacción con un receptor mediador de la endocitosis [7]. Una vez que las lipoproteínas interactúan con LDLR son introducidas al interior de la célula a través de vesículas rodeadas de clatrina y son liberadas mediante la degradación de estas vesículas por parte de los lisosomas.

LDLR al igual que otras moléculas de superficie de los hepatocitos ha sido identificado como un co-receptor necesario para HCV en su entrada al hígado. Como ya se ha mencionado con anterioridad diversos estudios evidencian que LDLR supone un punto de anclaje inicial para el virus ya que parece contribuir junto GAGs a la concentración de las partículas virales en la superficie celular del hepatocito [16]. Estudios recientes llevados a cabo *in vitro*, utilizando pseudopartículas de HCV, han determinado que la co-expresión de SR-B1 y CD81 es necesaria para la internalización de HCV en las células pero no suficientes, HCV también requiere de la expresión de LDLR para su internalización [17].

LDLR es un co-receptor utilizado por partículas virales asociadas a lipoproteínas (LVPs) para su entrada en la célula. Por lo que a diferencia de otros co-receptores LDLR parece no interactuar con la glicoproteína E2 del virus para su anclaje a la superficie celular, sino que interactúa con moléculas propias de las lipoproteínas como Apo B y Apo E [9]. Esta tesis es justificada por la observación de existe una competencia activa entre las partículas virales asociadas a lipoproteínas y LDL por su unión LDLR [4]. Hoy día se piensa que el virus es capaz de adueñarse de la capacidad de LDLR de capturar lipoproteínas del torrente sanguíneo para introducir colesterol al interior de los hepatocitos.

Aumentando así la entrada de este en el hígado[9]. Este hecho se ve reforzado por diversos estudios, los cuales han evidenciado la presencia de hipo- β - lipoproteinemia y hipocolesterolemia en pacientes infectados con HCV [4]. Aunque parece clara la necesidad e intervención de LDLR en la entrada de HCV en el hígado, la participación o función de este

receptor en el ciclo vital del virus es tema de controversia dentro de la comunidad científica[9]. Existen diversos estudios que ponen en duda su importancia en la entrada del virus y la morbilidad causada por la interacción ApoE-LDLR. Si se está de acuerdo en el hecho de que LDLR juega un papel fundamental en el ciclo de vida del virus, se ha observado que LDLR juega también un papel vital en etapas post-anclaje del virus, más concretamente en la replicación del virus en el citoplasma celular [9].

La importancia de LDLR en el ciclo vital del virus se encuentra confirmada en el hecho de que HCV es capaz de regular la expresión de LDLR, más concretamente, es capaz de aumentar la expresión de LDLR en la superficie de los hepatocitos, un fenómeno molecular observado en los pacientes infectados por HCV [2]. HCV es capaz de incrementar la transcripción del gen que codifica LDLR a través de SREBPs, no se sabe de forma clara como HCV activa SREBPs, pero si se ha observado dicha interacción[2]. HCV también es capaz de interaccionar con PCSK9, una proteína cuya función es la regulación de la ruta de activación de la transcripción mediada por SREBPs, ya que actúa inhibiéndolo. HCV actúa disminuyendo los niveles de PCSK9, bloqueando en gran medida su acción inhibitoria sobre SREBPs, aumentando a su vez de esta manera la expresión de LDLR, HCV parece no afectar a los niveles de expresión de PCSK9 sino que se ha observado que favorece la degradación de esta proteína por parte del complejo proteasoma. En definitiva, ambos procesos producen un aumento de la expresión de LDLR en la superficie celular de los hepatocitos [2]. Además existen diversos estudios experimentales y clínicos que evidencian la importancia de LDLR como molécula de anclaje de HCV a la superficie de los hepatocitos. Los niveles de ARNm en hepatocitos primarios se correlacionan con los niveles de expresión de LDLR y la eficiencia de captación LDL por parte de este, también se ha observado que la presencia de LDL soluble puede inhibir la capacidad infectiva del virus y está asociada con una respuesta virológica prolongada (SRV) antes de llevar a cabo un tratamiento con Peg-INF y RBV [20].

Algunos estudios evidencian que LDLR presenta un mayor papel en etapas post-entrada del ciclo de vida, que en la entrada del virus aumentando la entrada de lípidos al interior de los hepatocitos, los cuales son esenciales para la replicación de HCV [20]. HCV promueve la expresión de LDLR probablemente para aumentar la entrada de lípidos al interior de los hepatocitos y así producir un ambiente intracelular lipídico, el cual es fundamental para su replicación [2].

Por lo que se puede concluir que LDLR parece tener un doble papel en el ciclo celular de HCV. 1- La entrada del virus en los hepatocitos y 2- El mantenimiento de la infección favoreciendo la replicación. Un hecho de gran importancia que se ha descubierto de forma reciente es que polimorfismos en LDLR, los cuales están asociados con los niveles de LDL en plasma, tienen un gran impacto sinérgico en la probabilidad de que se produzca una respuesta viral sostenida (SRV) en pacientes infectados con los genotipos 1 y 4 tratados con Peg-INF y RBV. Por lo tanto estos polimorfismos podrían suponer o determinar un tipo de protección intrínseca o innata a la infección por HCV. Lo cual significa la existencia de una posibilidad de protección genética e innata a la entrada de HCV al hígado y por tanto a la consecución de infección. Para determinar la importancia de LDLR en la entrada de HCV, en los últimos años se han estado realizando estudios *in vitro*, en los cuales se han desarrollado partículas virales artificiales las cuales expresan las glicoproteínas de la envuelta (E1 y E2), estas partículas son denominadas HCVpp y se utilizan para determinar su capacidad de interacción con células que expresen LDLR[18]. También se han llevado a cabo estudios genéticos, en los cuales, se ha llevado la búsqueda de determinados polimorfismos o haplotipos asociados con tasas diferenciales de la entrada del virus a determinadas células hepáticas [20]. Uno de los estudios genéticos más recientes realizados, fue llevado a cabo por Caruz A, Neukan K, Rivero-Juarez A, et al. En él se busca la asociación de diferentes genotipos o polimorfismos de LDLR con los niveles de carga viral. Tras llevar a cabo el genotípico de 144 SNPs en 40 regiones candidatas de tener un papel de importancia en el transporte de colesterol y otros SNPs asociados previamente con la evolución clínica de HCV. Encontraron dos SNPs en *LDLR* que presentan una asociación significativa con la carga viral en pacientes no tratados o pre-tratamiento. Sin embargo, encontraron que el efecto de los SNPs en la carga viral, solo se encuentra restringido a pacientes infectados con el genotipo 1 y 4 del virus, mientras que en los pacientes infectados con el genotipo 3 no se observa este efecto. Los SNPs que presentan asociación significativa con la carga viral en pacientes no tratados o pre-tratamiento son rs1433009 y rs2569540, ambos localizados en intrones o zonas regulatorias cercanas a la región promotora o a la región 3' UTR. Se ha determinado que el alelo A de rs1433009, localizado en la región 3' UTR se ha identificado como un marcador genético asociado con bajos niveles de carga viral y de LDL y colesterol [20]. Probablemente las bases moleculares de este fenotipo se deben a una alteración de la vida media del ARNm en los genotipos AA y AG, los cuales presentan unos niveles significativamente bajos de expresión de ARNm, con respecto, al genotipo GG produciendo una menor tasa de expresión de LDLR y por tanto de entrada de colesterol al interior del hígado y por tanto una menor entrada del virus [20]. El

SNPs rs2569540 juega un papel importante en la estabilidad de ese ARN mensajero por lo que también es fundamental en los niveles de expresión del mismo [20]. A pesar del descubrimiento de estas asociaciones hay que tener en cuenta algunas observaciones. El efecto de las variaciones genéticas de *LDLR* en la carga viral solo afecta a los genotipos 1 y 4 de HCV, siendo menor en el genotipo 3 del virus, lo cual probablemente es debido a que el genotipo 3 de HCV no utiliza *LDLR* como co-receptor en su anclaje a la superficie celular [20]. Diversos estudios evidencian que la proteína C o Core y la proteína NS4B son unos inductores óptimos de la lipogénesis hepática en el genotipo 3 del virus. Por lo que la replicación del genotipo 3 de HCV dependería en mayor medida de la biosíntesis de colesterol intrahepática [20] siendo en gran medida independiente de la retirada de colesterol desde el plasma sanguíneo hacia el interior de los hepatocitos. Por otra parte los genotipos 1 y 4 del virus necesitarían una entrada suplementaria de colesterol al hepatocito, a través de *LDLR*, siendo este fundamental para su replicación y su ciclo de vida. Por lo tanto los genotipos AA y AG producirían una menor de entrada de colesterol al interior del hígado y por tanto proporcionarían una protección intrínseca a la infección por los genotipos 1 y 4, con respecto al genotipo GG, en el cual los niveles de expresión de *LDLR* son normales.

Objetivos.

El objetivo de este trabajo es la amplificación y purificación de las glicoproteínas de la envuelta (E1-E2) de cada uno de los genotipos del virus, desde el genotipo 1 al 6, para evaluar posteriormente, *in vitro*, su capacidad de anclaje a *LDLR* expresados en células hepáticas, con el fin de determinar la importancia de *LDLR* en la entrada de HCV en el hígado y el efecto de los diferentes genotipos del virus en su capacidad o necesidad de unirse a este receptor, pues en los últimos años se han publicado diversos trabajos en los cuales se han asociado a determinados genotipos de HCV con la utilización de *LDLR* como un co-receptor necesario para su entrada en el hígado. Más concretamente a los genotipos 1 y 4. El objetivo de este trabajo es determinar la importancia de *LDLR* en la entrada en el hígado y el efecto del resto genotipos del virus en su capacidad o necesidad de unirse a este receptor.

Materiales y Métodos.

El objetivo de este trabajo fue el de amplificar y purificar las glicoproteínas de la envuelta cada uno de los de los genotipo virales para determinar *in vitro* su capacidad de interacción con *LDLR* de células hepáticas.

Amplificación de las glicoproteínas E1 y E2 de los diferentes genotipos. Las secuencias de ADN de las glicoproteínas de la envuelta del virus, E1 Y E2, fueron aisladas a partir de muestras procedentes de pacientes infectados con diferentes genotipos de HCV del hospital de Córdoba y Sevilla. El ARN viral fue aislado a partir de 100µL de suero, este aislamiento se llevó a cabo mediante un kit de extracción total de ARN (Roche) [18]. Tras aislar el ARN viral se procedió a la obtención de cDNA específico de cada uno de los genotipos utilizando primers específicos de cada uno de ellos, dichos cebadores fueron utilizados posteriormente para llevar a cabo la amplificación de dicho cDNA viral. Cabe destacar que para llevar a cabo la amplificación de ambas glicoproteínas se utilizaron dos tipos de primers, iguales a los de la referencia [18]. Uno externo o Outer y otro interno o Inner, específicos de cada uno de los genotipos de virus, debido a la elevada longitud de la secuencia a amplificar. A partir de 4 µL de cDNA viral se llevó a cabo una primera PCR utilizando los primers externos (Outers) [18]. Una vez producida la amplificación se llevó a cabo una segunda PCR a partir de 2 µL de producto de la primera y utilizando los cebadores internos, consiguiendo así llevar a cabo la amplificación de la secuencia completa. En ambos casos la amplificación se llevó a cabo usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Pfu (Roche) y siguiendo el siguiente protocolo de amplificación, 94°C durante 2 minutos, 25x(94°C durante 45s, 50°C durante 45s, 68°C durante 90s, extendiendo 5s por ciclo) y 68°C durante 7 minutos [18].

Clonación del producto de PCR en vectores plasmídicos. Este proceso puede dividirse en tres pasos. 1-Preparación del producto de PCR 2-Ligación del inserto al vector y 3-Transformación de bacterias competentes ,todos ellos llevados a cabo siguiendo el procedimiento indicado en el StrataClone PCR cloning system [19]. La preparación del producto de PCR consistió en el análisis de dicho producto en un gel de agarosa para verificar la amplificación de dicho producto, la ausencia de contaminación y que presentara el tamaño molecular adecuado (2,5Kb) [19]. Debido a que el fragmento es inferior a 3 Kb se preparó una dilución 1:10 del producto, tal y como viene reflejado en el protocolo. 2- La ligación del inserto al vector se realizó mediante la mezcla de 3 µL de tampón de clonación StrataClone 2 µL del producto de PCR y 1 µL del Vector T, tras realizar la mezcla se mezcló enérgicamente mediante pipeteo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min. La transformación de bacterias competentes StrataClone se llevó a cabo en una serie de pasos consecutivos de acuerdo al StrataClone PCR cloning system.

Análisis de transformantes. Una vez llevada a cabo la transformación de las bacterias competentes, estas fueron cultivadas en medios LB- ampicilina para llevar a cabo el análisis

del ADN plasmídico. Tras su cultivo a 37°C, se llevó a cabo la selección de colonias blancas transformantes y recombinantes, desechándose colonias azules transformantes no recombinantes. En total se llevó a cabo el cultivo de 3 placas LB-ampicilina en las cuales se cultivaron un total de 60 clones. Los cultivos fueron conservados en cámara fría a 4°C.

Aislamiento y análisis del ADN recombinante. Tras llevar a cabo la selección de las colonias se llevó a cabo una miniprep de ADN utilizando una serie de protocolos estándar encaminados al aislamiento de plásmidos [19] y se cuantificó la cantidad de plásmido mediante su análisis por espectrofotometría en ultravioleta. Para identificar si el plásmido presentaba el inserto o no lo presentaba se llevó a cabo un ensayo de restricción del plásmido aislado mediante la miniprep. Este ensayo se llevó a cabo utilizando EcoRI, bajo las condiciones del fabricante. Tras llevar a cabo el ensayo de restricción se realizó una electroforesis con el producto para determinar si los clones presentaban o no el inserto de 2.5 Kb.

Secuenciación del inserto. Una vez que se obtuvo el producto de restricción para llevar a cabo la confirmación de que el inserto eran los genes codificantes de las glicoproteínas virales, se llevó a cabo una secuenciación del inserto. Dicha secuenciación fue realizada por la empresa Sistemas Genómicos, utilizando el método de Sanger.

Resultados.

Aislamiento de las glicoproteínas E1 y E2 de los diferentes genotipos y construcción de elementos de expresión. A pesar de que el objetivo de este trabajo fue el de conseguir aislar y amplificar los genes de las glicoproteínas de la envuelta de los diferentes genotipos del HCV solo se consiguió el aislamiento y la amplificación del genotipo 3 del virus. No se sabe con exactitud cual pudo ser el fallo que impidió la amplificación de los del resto de genotipos del virus, se sospecha que pudo ser debido a un mal estado de las muestras de partida aunque no se descarta que el fallo pudiera ser debido al factor humano.

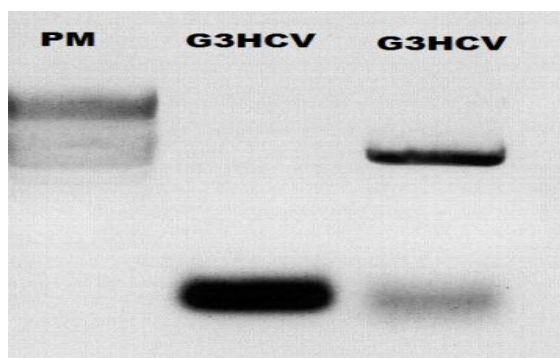


Figura.2: Electroforesis en agarosa correspondiente a la amplificación de las glicoproteínas de la envuelta del genotipos 1 y 3 de HCV en formato invertido.

Análisis del ADN recombinante de las bacterias recombinantes. Tras llevar a cabo el aislamiento de las glicoproteínas de la envuelta el genotipo 3 de HCV, estas se clonaron en un vector de clonación T y se introdujeron según el protocolo StrataClone en *E. coli* competentes. Estas bacterias fueron cultivadas en tres placas LB-ampicilina obteniéndose un total de 60 clones bacterianos. De todos los clones se seleccionaron aquellos que constituyeron colonias blancas, transformantes y recombinantes. Tras llevar a cabo diversas miniprep se y correrlas en electroforesis en geles de agarosa utilizando clones azules como controles negativos, se seleccionaron 17 clones candidatos con inserto (8,17,26,27,27,42,43,44,45,47,48,49,50,51,52,53,54). Tras un primer análisis se llevó una segunda selección de los clones que presentaban el plásmido de forma más marcada o clara y se llevó a cabo de nuevo una miniprep con estos clones para la obtención de una mayor cantidad de muestra . Estos clones fueron (8,17,49,50,53 y 54).

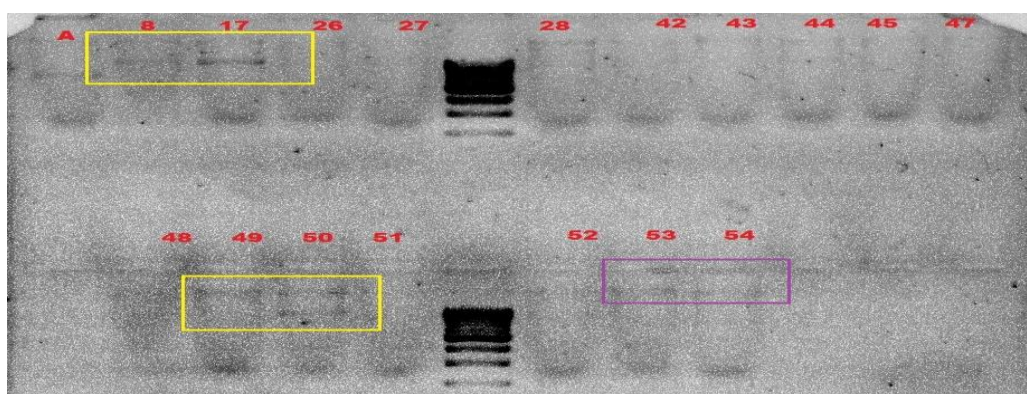


Figura.3: Electroforesis en agarosa correspondiente al plásmido aislado por miniprep colonias(8,17,26,27,27,42,43,44,45,47,48,49,50,51,52,53,54).

Cuantificación del plásmido y Ensayo de restricción con EcoRI. La cuantificación mostró unos valores adecuados de ratio y de concentración plasmídica para la mayoría de los clones excepto para el clon 50, que presentó una concentración plasmídica de 60 ng/μL. Tras determinar que la concentración de ADN era la adecuada se llevó a cabo un ensayo de restricción con EcoRI para determinar que el plásmido presentara inserto y este se corrió en electroforesis de agarosa utilizando como controles negativos los plásmidos de los mismos clones pero sin cortar. De los clones seleccionados solo los clones 49, 53 y 54 presentaban de forma clara el inserto con un peso molecular adecuado de 2,5Kb, sin embargo, para confirmar que presentaban el gen correspondiente a las glicoproteínas de la cubierta del genotipo 3 de HCV todos los clones se enviaron a secuenciar.

Muestra	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	Ratio	ng/ μ L
Clon 8	4,62	2,9	1,6	226,5
Clon 17	3,62	2,1	1,6	156
Clon 49	4,62	2,91	1,6	227
Clon 50	1,21	0,76	1,6	60
Clon 53	4,32	2,47	1,6	210
Clon 54	4,94	3,08	1,6	247

Figura.4: Tabla en la cual se muestra el análisis en nanodrop de la concentración plasmídica de los clones seleccionados (8,17,49,50,54).

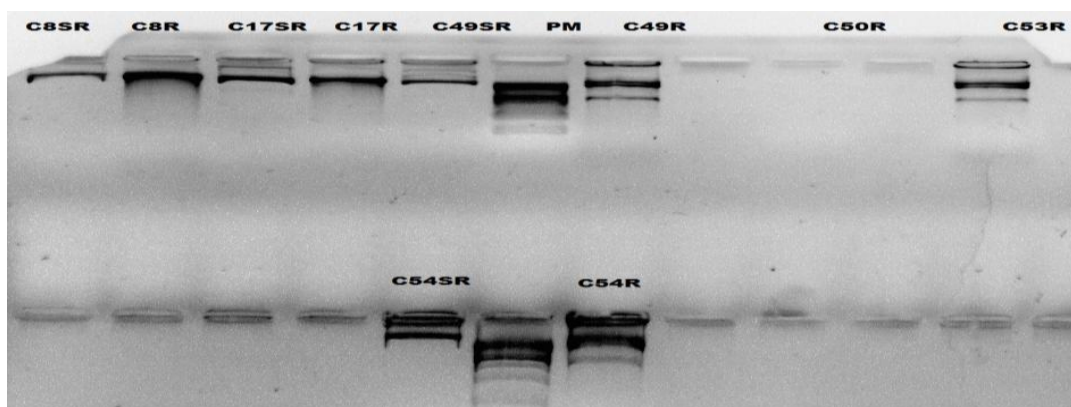


Figura.5: Electroforesis en gel de agarosa del ensayo de restricción con EcoRI. Los clones que presentan las siglas SR son muestras de plásmidos sin digerir de dichos clones y son utilizados como controles negativos. Los clones con la sigla R son muestras de plásmidos ,en los cuales se ha llevado a cabo el ensayo de restricción. Clones positivos con inserto, clones 49,53 y 54.

Resultados de la secuenciación. Para confirmar que los clones que presentaban tanto plásmido , como inserto (8,17,49,50,53,54) albergaban los genes correspondientes a la envuelta glicoproteica del genotipo 3 del virus HCV, estos se mandaron a secuenciar a la unidad de genómica de la universidad de Valencia. Tras recibir las secuencias correspondientes a cada uno de los clones se llevo a cabo su procesamiento mediante el programa Bioedit llevando a cabo un alineamiento de las secuencias para determinar si estas coincidían o presentaban discordancias. Después se realizó un BLAST con las secuencias para determinar si verdaderamente estas corresponden a los genes correspondientes a la envuelta glicoproteica del genotipo 3 del virus HCV. El alineamiento de las secuencias muestra que todos los clones presentan, salvo pequeños Gaps y ciertos cambios de base, la misma secuencia de nucleótidos.

10 20 30 40 50 60
|...||...||...||...||...|
 clon8 NNNNN**A**NNNN NNNN**TAGGGC GATT--GGAG CTCCCGCGG- TGCGGCCGCT CTAGAACTAG**
 clon17 -NNNNNNNNNN NNNN**TAGGGC GATT--GGAG CTCCCGCGG- TGCGGCCGCT CTAGAACTAG**
 clon49 --NNNNNNNNN NNN**A****AGGGC GATT--GGAG CTCCCGCGG- TGCGGCCGCT CTAGAACTAG**
 clon53 NNNNN**A**NN**A**N **T**NN**ATAGGGC G**NN**T**T**IN****GGAG CTCCCGCGG- TGCGGCCGCT CTAGAACTAG**
 clon54 NNNNNNNNNN NNNN**T**A**NGGC GATT--GGAG CTCCCGCGG- TGCGGCCGCT CTAGAACTAG**

70 80 90 100 110 120
|...||...||...||...||...|
 clon8 **TGGATCCCCC GGGCTGCAGC CCAATGTGGA ATTGCGCCTT CACCCATGGG TTGCTCTTTT**
 clon17 **TGGATCCCCC GGGCTGCAGC CCAATGTGGA ATTGCGCCTT CACCCATGGG TTGCTCTTTT**
 clon49 **TGGATCCCCC GGGCTGCAGC CCAATGTGGA ATTGCGCCTT CACCCATGGG TTGCTCTTTT**
 clon53 **TGGATCCCCC GGGCTGCAGC CCAATGTGGA ATTGCGCCTT CACCCATGGG TTGCTCTTTT**
 clon54 **TGGATCCCCC GGGCTGCAGC CCAATGTGGA ATTGCGCCTT CACCCATGGG TTGCTCTTTT**

130 140 150 160 170 180
|...||...||...||...||...|
 clon8 **TCTATCTTCC TTCTC**G**CTCT GTTCTCTTGC TTAAT**C**CATC CAGCAACTAG TCTAGAGTGG**
 clon17 **TCTATCTTCC TTCTC**G**CTCT GTTCTCTTGC TTAAT**C**CATC CAGCAACTAG TCTAGAGTGG**
 clon49 **TCTATCTTCC TTCTCACTCT GTTCTCTTGC TTAATTCATC CAGCAACTAG TCTAGAGTGG**
 clon53 **TCTATCTTCC TTCTCACTCT GTTCTCTTGC TTAATTCATC CAGCAACTAG TCTAGAGTGG**
 clon54 **TCTATCTTCC TTCTCACTCT GTTCTCTTGC TTAATTCATC CAGCAACTAG TCTAGAGTGG**

190 200 210 220 230 240
|...||...||...||...||...|
 clon8 **CGGAATACGT CTGGCCTCTA **C**GTCCTTACC AACGACTGTT CCAATAGCAG TATTGTGTAT**
 clon17 **CGGAATACGT CTGGCCTCTA **C**GTCCTTACC AACGACTGTT CCAATAGCAG TATTGTGTAT**
 clon49 **CGGAATACGT CTGGCCTCTA **C**ATCCTTACC AACGACTGTT CCAATAGCAG TATTGTGTAT**
 clon53 **CGGAATACGT CTGGCCTCTA **C**ATCCTTACC AACGACTGTT CCAATAGCAG TATTGTGTAT**
 clon54 **CGGAATACGT CTGGCCTCTA **C**ATCCTTACC AACGACTGTT CCAATAGCAG TATTGTGTAT**

250 260 270 280 290 300
|...||...||...||...||...|
 clon8 **GAGGCCG**A**CG AC**G**TCATTCT GCAC**G**CACCC GG**T**TGCGTAC CTTGTGTCCA GA**A**CAACG**G****T****
 clon17 **GAGGCCG**A**CG AC**G**TCATTCT GCAC**G**CACCC GG**T**TGCGTAC CTTGTGTCCA GA**A**CAACG**G****T****
 clon49 **GAGGCCGCGC AC**G**TCATTCT GCACACACCC GGCTGCGTAC CTTGTGTCCA GATCAACGAT**
 clon53 **GAGGCCGCGC AC**G**TCATTCT GCACACACCC GGCTGCGTAC CTTGTGTCCA GATCAACGAT**
 clon54 **GAGGCCGCGC AC**G**TCATTCT GCACACACCC GGCTGCGTAC CTTGTGTCCA GATCAACGAT**

310 320 330 340 350 360
|...||...||...||...||...|
 clon8 **ACACCTA**T**GT GCTGGACCCC AGTGACACCT ACAGTGGCAG TTAGGTACGT CGGAGCAACC**
 clon17 **ACACCTA**T**GT GCTGGACCCC AGTGACACCT ACAGTGGCAG TTAGGTACGT CGGAGCAACC**
 clon49 **ACACCTACGT GCTGGACCCC AGTGACACCT ACAGTGGCAG TTAGGTACGT CGGAGCAACC**
 clon53 **ACACCTACGT GCTGGACCCC AGTGACACCT ACAGTGGCAG TTAGGTACGT CGGAGCAACC**
 clon54 **ACACCTACGT GCTGGACCCC AGTGACACCT ACAGTGGCAG TTAGGTACGT CGGAGCAACC**

370 380 390 400 410 420
|...||...||...||...||...|
 clon8 **ACCGCTTCGA TACGCAGTCA TGT**A**GACCTA TTA**G**T**A**GGCG CGGCCACGGC GTGCTCTGCA**

clon17 ACCGCTTCGA TACGCAGTCA TGTAGACCTA TTAGTAGGCG CGGCCACGGC GTGCTCTGCA
clon49 ACCGCTTCGA TACGCAGTCA TGTGGACCTA TTAATGGGCG CGGCCACGGC GTGCTCTGCA
clon53 ACCGCTTCGA TACGCAGTCA TGTGGACCTA TTAATGGGCG CGGCCACGGC GTGCTCTGCA
clon54 ACCGCTTCGA TACGCAGTCA TGTGGACCTA TTAATGGGCG CGGCCACGGC GTGCTCTGCA

430 440 450 460 470 480
....|....||....||....||....||....|

clon8 CTTTACGTGG GTGACTTGTC TGGGGCCGTC TTTCTCGTGG GACAAGCCTT CACAATTCAGT
clon17 CTTTACGTGG GTGACTTGTC TGGGGCCGTC TTTCTCGTGG GACAAGCCTT CACAATTCAGT
clon49 CTTTACGTGG GTGACTTGTC TGGGGCCGTC TTTCTCGTGG GACAAGCCTT CACGTTTCAGC
clon53 CTTTACGTGG GTGACTTGTC TGGGGCCGTC TTTCTCGTGG GACAAGCCTT CACGTTTCAGC
clon54 CTTTACGTGG GTGACTTGTC TGGGGCCGTC TTTCTCGTGG GACAAGCCTT CACGTTTCAGC

490 500 510 520 530 540
....|....||....||....||....||....|

clon8 CCTCGTCGCG ATCAAACGGT CCAGACCTGT AACTGCTCGC TGTACCCAGG CCATCTTTCA
clon17 CCTCGTCGCG ATCAAACGGT CCAGACCTGT AACTGCTCGC TGTACCCAGG CCATCTTTCA
clon49 CCTCGTCGCG ATCACACGGT CCAGACCTGT AACTGCTCAC TGTACCCAGG CCATCTTTCA
clon53 CCTCGTCGCG ATCACACGGT CCAGACCTGT AACTGCTCAC TGTACCCAGG CCATCTTTCA
clon54 CCTCGTCGCG ATCACACGGT CCAGACCTGT AACTGCTCAC TGTACCCAGG CCATCTTTCA

550 560 570 580 590 600
....|....||....||....||....||....|

clon8 GGACATCGAA TGGCTTGGGA TATGATGATG AACTGGTCCC CCGCTGTGGG TATGGTGGTG
clon17 GGACATCGAA TGGCTTGGGA TATGATGATG AACTGGTCCC CCGCTGTGGG TATGGTGGTG
clon49 GGACATCGAA TGGCTTGGGA TATGATGATG AACTGGTCCC CCGCTGTGGG TATGGTGGTG
clon53 GGACATCGAA TGGCTTGGGA TATGATGATG AACTGGTCCC CCGCTGTGGG TATGGTGGTG
clon54 GGACATCGAA TGGCTTGGGA TATGATGATG AACTGGTCCC CCGCTGTGGG TATGGTGGTG

610 620 630 640 650 660
....|....||....||....||....||....|

clon8 GCGCATGTCT TCGCGCTTGCC CCAGACCTTG TTCGACATAA TAGCCGGGGC CCATTGGGGC
clon17 GCGCATGTCT TCGCGCTTGCC CCAGACCTTG TTCGACATAA TAGCCGGGGC CCATTGGGGC
clon49 GCGCATGTCT TACGCTTGCC CCAGACCTTG TTCGACATAA TAGCCGGGGC CCATTGGGGC
clon53 GCGCATGTCT TACGCTTGCC CCAGACCTTG TTCGACATAA TAGCCGGGGC CCATTGGGGC
clon54 GCGCATGTCT TACGCTTGCC CCAGACCTTG TTCGACATAA TAGCCGGGGC CCATTGGGGC

670 680 690 700 710 720
....|....||....||....||....||....|

clon8 ATCATGGCGG GCCTAGCCTA TTACTCCATG CAGGGCAACT GGGCCAAGGT CGCTATCATC
clon17 ATCATGGCGG GCCTAGCCTA TTACTCCATG CAGGGCAACT GGGCCAAGGT CGCTATCATC
clon49 ATCATGGCGG GCCTAGCCTA TTACTCCATG CAGGGCAACT GGGCCAAGGT CGCTATCATC
clon53 ATCATGGCGG GCCTAGCCTA TTACTCCATG CAGGGCAACT GGGCCAAGGT CGCTATCATC
clon54 ATCATGGCGG GCCTAGCCTA TTACTCCATG CAGGGCAACT GGGCCAAGGT CGCTATCATC

730 740 750 760 770 780
....|....||....||....||....||....|

clon8 ATGGTTATGT TTTCAGGGGT CGATGCTGTA ACACACACCA CCGGCAGCGG AAGCAGCTAGT
clon17 ATGGTTATGT TTTCAGGGGT CGATGCTGTA ACACACACCA CCGGCAGCGG AAGCAGCTAGT
clon49 ATGGTTATGT TTTCAGGGGT CGATGCTGTA ACACACACCA CCGGCAGCGG TCCAGCTAGG
clon53 ATGGTTATGT TTTCAGGGGT CGATGCTGTA ACACACACCA CCGGCAGCGG TCCAGCTAGG

clon54 ATGGTTATGT TTTCAGGGGT CGATGCTGTA ACACACACCA CCGGCAGCGG TCCAGCTAGG

790 800 810 820 830 840
|...||...||...||...||...||...|

clon8 AATACCAACA AGTTTGTGG ACTTTTAAAT CTAGGTGCCA GCCAGAACC TGCAGCTGAT
 clon17 AATACCAACA AGTTTGTGG ACTTTTAAAT CTANGTGCCA GCCAGAACC TGCAGCTGAT
 clon49 GCTGCCTCCG GGGTTGTTAG CCTTTTTAGT CCAGGTGCCC GCCAGAACC TGCAGCTGAT
 clon53 GCTGCCTCCG GGGTTGTTAG CCTTTTTAGT CCAGGTGCCC GCCAGAACCC TGCAGCTGAT
 clon54 GCTGCCTCCG GGGTTGTTAG CCTTTTTAGT CCAGGTGCCC GCCAGAACC TGCAGCTGAT

850 860 870 880 890 900
|...||...||...||...||...||...|

clon8 CAACACCAAT GGC TCGTGGC ACATCAACAG AACTGCCCTG AACTGCAATG AGTCCATAAA
 clon17 CAACACCAAT GGC TCGTGGC ACATCAACAG AACTGCCCTG AACTGCAATG AGTCCATAAA
 clon49 CAACACCAAT GGTTCGTGGC ACATCAACAG AACTGCCCTG AACTGCAATG AGTCCATAAA
 clon53 CAACACCAAT GGTTCGTGGC ACATCAACAG AACTGCCCTG AACTGCAATG AGTCCATAAA
 clon54 CAACACCAAT GGTTCGTGGC ACATCAACAG AACTGCCCTG AACTGCAATG AGTCCATAAA

910 920 930 940 950 960
|...||...||...||...||...||...|

clon8 CACCGGATTC TTAGCTGGGT TGT TTTTATTA TCATAAGTTC AACTCTACTG GATGCCCTCA
 clon17 CACCGGATTC TTAGCTGGGT TGT TTTTATTA TCATAAGTTC AACTCTACTG GATGCCCTCA
 clon49 CACCGGATTC ATAGCTGGGT TATTTAATTA TCATAAGTTC AACTCTACTG GATGCCCTCA
 clon53 CACCGGATTC ATAGCTGGGT TATTTAATTA TCATAAGTTC AACTCTACTG GNTGCCCTCA
 clon54 CACCGGATTC ATAGCTGGGT TATTTAATTA TCATAAGTTC AACTCTACTG GATGCCCTCA

970 980 990 1000 1010 1020
|...||...||...||...||...||...|

clon8 CAGG-CTCAG CAGCTGCAAG CCCCTCACTT -CCTTTGATC NNNNG-GGGC CCCTTNGACA
 clon17 CAGG-CTCAG CAGCTGCAAG CCCCTCACTT -CCN TTGATC AAGGGN GGGG CCCCITGACA
 clon49 CAGGGCTCAG CAGCTGCAAG CCNCCTCACTT TCCTTTCAGC AGGGGTGGGG CCCCCTGACA
 clon53 CAGG-CTCAG CAGCTGCAAG CCCCTCACTT CCCTTTCAGC AGGGGTGGGG CCCCCTGACA
 clon54 CAGG-CTCAG CAGCTGCAAG CCCCTCACTT CCCTTTCAGC AGGGGTGGGG CCCCCTGACA

1030 1040 1050 1060 1070 1080
|...||...||...||...||...||...|

clon8 GATGCTAAN-A TCACCGGGTC CTNCTGATGA CAAA NN-N-A CTGCTGG-CA CTATC CACCT
 clon17 GATGCTAACA TCACCGG NNC NTNCTGATGA NAANCC-GTA CTGCTGG-CA CTATC CACCT
 clon49 GATGCTAACA TCAN CN GGN CTTCTGATGA NNN AACN GTA CTGCTGG-NA CTACGCACCN
 clon53 GATGCTAACA TCACCN GGTG CTNCTGATGA CAANCC-GTA CTGCTGG-CA CTACGCACCT
 clon54 GATGCTAACA TCACC-GGTC CTNCTGATGA NNNNN--GTA CTGCTGGNCA CTACGCACCT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
|...||...||...||...||...||...|

clon8 NNNN--TTGT GATN N--TC CNGNGGC-A ATGTCT NNNN NNNN--GTAC N GNNI NACAN
 clon17 I NNN CCTTGT GAT NNNN--CC CNGN GN--A ATNN CTG NNN NNC NNN GTAC N GNN TC NNNN
 clon49 AGN ANCTTG N GATATCGT N C NNNNNNNN AA TG T NCTG NNN NNC NNN GTAC N GNNNNNNA AC
 clon53 TAN ACCN INI GATATCGN CC CGG NNGN--A AANNTCT GNN NCC NNNN TAC TC NNNNNNNNC
 clon54 -A NACCT NNN GATATCGTTC C NNNN GT--A NNNN CNGCCN NNC NNN GTAC N GNNI NACNC

1150 1160 1170 1180 1190 1200

[illegible]

clon8 NNNNNN**A**NNN N**GG**NNN**G**NNN N**C**NNN----- --
clon17 NNNGNNN**T**NN NN**GG**NN**GGGT** NNN**T**TNN--- --
clon49 NN**G**NNNNNNN NNNNNNNNNN **GC****GC**TINN-- --
clon53 **G**NN**A**NAANN NANA**ACGG**NN NNNNNNN**T**NN NN
clon54 NN**AA**NG**A**NN N**GGGA**NNNN NN**C**----- --

>Consenso

El BLAST de la secuencia consenso de todos los clones, muestra un alineamiento de un 90% para las proteínas de la envuelta del genotipo 3a de HCV, más concretamente para La secuencia correspondiente a Hepatitis C virus isolate UKN3A4.5/SP-2/A4/16.01.1995 envelope gene, partial cds, ID: gb|AY958008.1. Los datos del gen y el alineamiento con la secuencia consenso se muestran a continuación.

Download ▾ GenBank Graphics					
Hepatitis C virus genes for E2/NS1 protein, envelope protein, core protein, partial cds, isolate: HEM26					
Sequence ID: dbjID14311.1 HPCHEM26CE Length: 1786 Number of Matches: 1					
Range 1: 788 to 1762 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1279 bits(692)	0.0	886/981(90%)	8/981(0%)	Plus/Plus	
Query 98	GGTTGCTCTTTTCTATCTTCTCTCACTCTGTTCTCTTGCTTAATTCATCCAGCAACT	157			
Sbjct 788	GGTTGCTCCTTTTCTATCTTCTCTCTTGCTCTGTTCTCTTGCTTAATTCATCCAGCAGCC	847			
Query 158	AGTCTAGAGTGGCGGAATACGTCTGGCCTCTACATCCTTACCAACGACTGTTCCAATAGC	217			
Sbjct 848	AGTCTAGAGTGGCGGAACACGTCTGGCCTCTACGTCTTACCAACGACTGTTCCAATAGC	907			
Query 218	AGTATTGTGTATGAGGCCGCGACGTCAATCTGCACACACCCGGCTGCGTACCTTGTGTC	277			
Sbjct 908	AGTATTGTGTATGAGGCCGATGACGTCAATCTGCACACACCCGGCTGTGTGCTTGTGTT	967			
Query 278	CAG-ATCAACGATACACCTACGTGCTGGACCCAGTGACACCTACAGTGGCAGTTAGGTA	336			
Sbjct 968	CAGGAT-GGCAATAAATCCACGTGCTGGACTCCAGTGACACCTACAGTGGCAGTCAAGTA	1026			
Query 337	CGTCGGAGCAACCAACCGCTTCGATACGCAGTCATGTGGACCTATTAAATGGCGCGGCCAC	396			
Sbjct 1027	TGTCGGAGCAACCAACCGCTTCGATACGCAGTCATGTGGACCTATTAGTAGGCGCGGCTAC	1086			
Query 397	GGCGTGCTCTGCACCTTACGTGGGTGACTTGTGTGGGGCGCTTTCTCGTGGGACAAGC	456			
Sbjct 1087	GACGTGCTCTGCGCTCTACGTGGGTGATATGTGTGGGGCTGTCTTTCTCGTGGGACAAGC	1146			
Query 457	CTTACAGTTACAGCCCTCGTCGCCATCACACGGTCCAGACCTGTAACCTGCTCACTGTACCC	516			
Sbjct 1147	CTTACAGTTACAGACCTCGTCGCCATCAACCGGTCCAGACCTGTAACCTGCTCACTGTACCC	1206			
Query 517	AGGCCATCTTTTCAGGACATCGAATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGTCCCCGCTGT	576			
Sbjct 1207	AGGCCATCTTTTCAGGACATCAAAATGGCTTGGGATATGATGATGAATTGGTCCCCGCTGT	1266			
Query 577	GGGTATGGTGGTGGCGCATGTCTTACGCTTGGCCAGACCTTGTTCGACATAATAGCCGG	636			
Sbjct 1267	GGGTATGGTGGTGGCGCACGTCTGCGTTTGGCCAGACCTGTTCGACATAATAGCCGG	1326			
Query 637	GGCCCATTTGGGGCATCATGGCGGGCTAGCCTATTACTCCATGCAGGGCAACTGGGCCAA	696			
Sbjct 1327	GGCCCATTTGGGGCATCTTGGCGGGCTAGCCTATTACTCCATGCAGGGCAATTGGGCCAA	1386			
Query 697	GGTCGCTATCATTATGGTTATGTTTTTCAGGGGTCGATGCTGTAACACACACCACCGGAG	756			
Sbjct 1387	GGTCGCTATCATCGTGGTTATGTTTTTCAGGGGTCGATGCCGAAACATATACCACCGGTGG	1446			
Query 757	CGGTCCAGCTAGGGCTGCCTCCGGGGTTGTTAGCCTTTTTAGTCCAGGTGCCCGCCAGAA	816			
Sbjct 1447	CAGTGTGGCTCATGCTACCAGAGGGATAGCTAGTCTTTTTACTGTGGGCGCCCGCCAGAA	1506			
Query 817	CCCTGCAGCTGATCAACACCAATGGTTCTGTGGCACATCAACAGAACTGCCCTGAACCTGCA	876			
Sbjct 1507	A-CTGCAGCTGGTCAACACCAATGGCTCGTGGCACATCAACAGTACTGCCCTGAACCTGCA	1565			
Query 877	ATGAGTCCATAAACACCGGATTTCATAGCTGGGTTATTTAATTATCATAAGTTCAACTCTA	936			
Sbjct 1566	ATGAGTCCATAAACACCGGGTTTCATAGCTGGGTTATTTAATTATCATAAGTTCAACTCTA	1625			
Query 937	CTGGATGCCCTCACAGGGCTCAGCAGCTGCAAGCCCTCACTTCCCTTTCA-GCAGGGGT	995			
Sbjct 1626	CTGGATGTCCTCACA-GGCTCAGCAGCTGTAAGCCATCACTTCC-TT-CAGGCAGGGGT	1682			
Query 996	GGGGCCCCCTGACAGATGCTAACATCACCGGGTCTTCTGATGACAAACCGTACTGCTGG	1055			
Sbjct 1683	GGGGCTCCTTGACAGATGCTAACATCTCCGGTTCGTCC-GAAGACAAACCGTACTGCTGG	1741			
Query 1056	CACTACGCACCTTAACTTGT	1076			
Sbjct 1742	CACTACGCACCTAGACCTTGT	1762			

Figura.6: Alineamiento de la secuencia consenso con la secuencia correspondiente a las glicoproteínas de la envuelta del genotipo 3.

Discusión:

La carga viral de HCV en muchos casos no se encuentra asociada a la progresión de la enfermedad y su significancia como indicador de la eficacia de los tratamientos antivirales es bastante limitada. Por lo tanto la identificación de factores genéticos que afecten o desempeñen un papel en el ciclo de vida del virus y sus mecanismos de entrada al hígado, pueden ser una herramienta muy importante para el desarrollo de nuevas drogas o tratamientos que actúen a nivel de las proteínas necesarias para la correcta entrada y replicación del virus con el fin de evitar ambos procesos y en definitiva el progreso de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo era la generación, amplificación y purificación de las glicoproteínas de la envuelta (E1 y E2) de los diferentes genotipos del virus de la hepatitis C, para posteriormente llevar a cabo un ensayo de infección *in vitro* con células hepáticas, las cuales, expresarían en su superficie el receptor LDL con el fin de determinar la importancia de LDLR en la entrada de HCV en el hígado y el efecto de los diferentes genotipos del virus en su capacidad o necesidad de unirse a este receptor.

Por desgracia los resultados obtenidos se encuentran por debajo de las expectativas esperadas, pues solo se ha conseguido lograr la amplificación de las glicoproteínas E1 y E2 de la envuelta de uno de los genotipos del virus, el genotipo 3, y su clonación en bacterias competentes StrataCloning. La presencia de los genes correspondientes a las glicoproteínas de la envuelta del genotipo 3 se confirmó mediante secuenciación. Por lo que en definitiva los resultados obtenidos en este trabajo es la amplificación de dichas proteínas y su clonación en bacterias competentes. Tras llevar a cabo la amplificación y la clonación de las glicoproteínas de la envuelta del genotipo 3, estas serían clonadas en vectores de expresión para generar con ellas HCVpp a partir de células HeLa, las cuales se utilizarían para llevar a cabo el ensayo de infección *in vitro* con células hepáticas con LDLR en su superficie y observar el efecto de LDLR en la entrada de las partículas virales pertenecientes a cada uno de los genotipos.

Una de las principales trabas que durante los últimos años se han encontrado los grupos de investigación encaminados a esclarecer los mecanismos de entrada del virus en el hígado, han sido las dificultades a la hora de obtener cantidades suficientes de HCV viriones a partir del suero de los pacientes y la falta de un sistema de cultivo que pudiera mantener de forma estable la replicación del virus. Sin embargo, durante los últimos años están surgiendo grupos de investigación los cuales han conseguido solventar este problema construyendo partículas con complejos elementos de expresión que le permiten a estas partículas expresar en su superficie las proteínas de la envuelta viral, como las glicoproteínas E1-E2, permitiendo el estudio de los mecanismos y elementos implicados en la entrada de HCV en el hígado tanto receptores candidatos como nuevos receptores.

A pesar de que los resultados de este trabajo se encuentran parcialmente incompletos existen otros trabajos en los cuales se han conseguido generar de manera exitosa HCVpp y realizar con ellas diferentes ensayos encaminados a esclarecer los mecanismos de entrada de HCV al interior de las células hepáticas y determinar el papel de LDLR en la entrada del virus y el efecto de su variabilidad genética en la capacidad de entrada de HCV en el hígado.

Bartosch et al. y Hsu et al. han sido dos grupos de investigación pioneros en la producción de estas pseudopartículas virales [26]. Ambos autores detectaron la capacidad de los retrovirus de incorporar heterólogos de glicoproteínas y su capacidad de expresar genes reportados desde partículas virales sin capacidad de replicación, estableciendo un conveniente y altamente reproducible modelo de infección basado en pseudopartículas virales, las cuales presentan glicoproteínas funcionales de HCV [26].

Bartosch, et al. generaron pseudopartículas virales portadoras de las glicoproteínas no modificadas de HCV en partículas retrovirales derivadas del virus de la murina leucina (MLV) [26]. La generación de las pseudopartículas se consiguió mediante la cotransfección de células renales embrionarias 293T, portadores de vectores de expresión codificantes, los cuales presentaban las glicoproteínas de la envuelta E1-E2 de los genotipos 1a y 1b del HCV, un elemento de empaquetamiento codificante de las proteínas nucleares retrovirales y un elemento de empaquetamiento con la proteína verde fluorescente (GFP) [26]. Tras generar las pseudopartículas determinó su capacidad infectiva utilizando cultivos con varias líneas celulares y en hepatocitos primarios humanos usando citometría de flujo o cultivos X-gal coloreados mediante GFP o β -galactosidasa. Las pseudopartículas presentaron un claro tropismo hacia células derivadas de hígado (Huh-7, PLC/PRF/5, and Hep3B) y hepatocitos primarios humanos [26].

Hsu, et al. llevó a cabo la generación y caracterización de HIV-1 mediante la utilización de partículas retrovirales pseudotipadas con glicoproteínas no modificadas de la envuelta de los genotipos 1a y 1b de HCV. Para la determinación de la capacidad infectiva y la detección cuantificación genética se utilizó luciferasa [26]. Al igual que Bartosch et al. encontró un marcado tropismo de estas pseudopartículas por las células hepáticas y que la infección puede ser neutralizada usando anticuerpos anti-E2 [26].

Bartosch B, Dubuisson J y Cosset FL [27] consiguieron producir de manera exitosa HCVpp *in vitro*, las cuales, presentaban proteínas E1-E2 funcionales del genotipo 1a del virus. Para obtenerlas llevaron a cabo la utilización de promotores de expresión dirigida CMV y vectores de expresión pCMV-7a, en los cuales se codificaron ambas glicoproteínas. Posteriormente consiguieron transferir esta unidad codificante a una unidad de empaquetamiento basada en el virus de la murina leucina MLV, MLV-GFP, capaz de codificar genes propios del vector de transferencia MLV y de la unidad CMV-GFP. Para llevar a cabo la generación de las HCVpp, se utilizaron células 293T, las cuales, fueron transfectadas con el vector de expresión.

A Ashfaq U, Qasim M, Z Yousaf M, et al. [24] También consiguieron generar HCVpp que expresaban de manera estable la proteína E2 del genotipo 3a del virus, con el objetivo de determinar el efecto inhibitorio de anticuerpos específicos anti-CD81 y anti- HCVE2 en la unión de las partículas virales con la proteína CD81, expresada en células Huh-7, mantenidas en cultivo en estado de semiconfluencia. Para producir las HCVpp, utilizaron promotores de expresión dirigida CMV y vectores de expresión pcDNA, en los cuales, se clonaron las glicoproteínas de la envuelta E1E2. Posteriormente y al igual que en el trabajo de Birke Bartosch, Jean Dubuisson y François-Loïc Cosset estas unidades de expresión dirigida fueron transferidas a vectores MLV-GFP los cuales transfectaron a células 293T para generar las pseudopartículas virales.

Bergera A, Girogloub T, Leutza A, et al[28]. Consiguieron llevar a cabo la medida de anticuerpos anti-HCV y células T CD8+ Y CD4+ HCV específicas, mediante la utilización de HCVpp. La construcción de las pseudopartículas HCVpp se llevó a cabo mediante el protocolo utilizado por François-Loïc Cosset.

Aunque no se ha conseguido producir las HCVpp, el protocolo en el cual se ha basado este trabajo para construir las pseudopartículas virales, y que se encuentra descrito en el apartado de materiales y métodos, es el llevado a cabo por Lavillete D, W. Tarr A, Voisset C, et al [18]. Este grupo de investigación consiguió de manera exitosa la generación de HCVpp de los diferentes genotipos del virus para llevar a cabo la caracterización del rango interno y las propiedades de los diferentes genotipos y subtipos del HCV. Este grupo de investigación consiguió confirmar la importancia del receptor CD81 y SR-BI en la entrada del virus en las células hepáticas, más concretamente en células HepG2, usando HCVpp del genotipo 1. También determinaron mediante la utilización de SiRNA, la presencia de un grado de implicación variable de SR-BI en la entrada a células Huh-7 de HCVpp correspondientes a los diferentes genotipos del virus, siendo su inhibición siempre negativa para la entrada de HCVpp pero con un grado de intensidad variable dependiendo del genotipo. Por último consiguieron observar que la presencia de anticuerpos contra las glicoproteínas de la envuelta de HCVpp puede neutralizar la capacidad infectiva de estas partículas, inhibiendo su capacidad de unión a receptores y por tanto de continuar con etapas posteriores del proceso infeccioso.

Centrándose en mayor profundidad en los moléculas de anclaje al virus Bartosch B, Vitelli A, Granier C, et al. [17] consiguieron producir HCVpp con las glicoproteínas de la envuelta E1 y

E2 ,generadas siguiendo un protocolo similar al de A Ashfaq U, Qasim M, Z Yousaf M, et al y llevar a cabo un ensayo infectivo in vitro con células procedentes de carcinoma hepatocelular humano (Huh-7) , (Hep3B), (HepG2), células procedentes de riñón embrionario humano 293, células procedentes de osteocarcinoma (HOS), (Molt-4), (TE671), (HeLa) y (CHO). Consiguiendo demostrar la importancia de la presencia de un ambiente ácido en la entrada del virus y que la coexpresión de SR-BI y CD81 es necesaria para la entrada del virus, con una implicación muy notable de la región hipervariable HRV1 de la glicoproteína E2, pero no suficiente, siendo de vital importancia la presencia de LDLR, también aportan la posibilidad de que estas tres moléculas forman un complejo con el cual interacciona el virus y que vital para su entrada.

Recientemente estudios de asociación genética, también muestran la importancia de LDLR en la entrada del virus. Caruz A, Neukan K, Rivero- Juarez A et al.[20] han conseguido mostrar el impacto de determinados polimorfismos localizados en la región 3' UTR del gen de ``LDLR`` en los niveles de carga viral de pacientes en fase de pretratamiento con Peg-INF y RVB, seleccionados de una cohorte de pacientes infectados de HCV procedentes de cinco unidades de seguimiento de de enfermedades infecciosas en España. Estos SNPs son rs1433009 y rs2569540, variaciones de estos dos SNPs producen una variación en la estabilidad, en la vida media y en la expresión del ARNm, el cual codifica el receptor de LDL. Los genotipos AA y AG del SNPs rs1433009 producen unos menores niveles de expresión de LDLR con respecto al genotipo GG, rs2569540 juega un papel importante en la estabilidad de ese ARN mensajero por lo que también es fundamental en los niveles de expresión del mismo. Estos actúan produciendo una mayor o menor expresión de LDLR, lo cual tiene un efecto en la carga viral de los genotipos 1 y 4, siendo menor en el genotipo 3. Estos resultados sugieren que LDLR presenta un papel fundamental en el ciclo de vida de los genotipos 1 y 4 del virus, jugando un papel más secundario en el ciclo de vida del genotipo 3.

Matas M, Picornell A, Cifuentes C, et al .[25] También llevaron a cabo un estudio de asociación genética en el que examinaron la frecuencia de determinados SNPs asociados con la respuesta al tratamiento, en una cohorte de pacientes coinfectados con HCV-HIV de la localidad de Mallorca. Especialmente frecuencias de SNPs de los genes que codifican IL28B, CTLA4, LDLR, HFE y determinados haplogrupos de ADN mitocondrial correlacionados con la recuperación de pacientes infectados con HCV tratados pegIFN-RBV. Este grupo de investigación consiguió determinar una fuerte relación entre la presencia de determinados polimorfismos en el SNPs rs12979860, aguas arriba del gen que codifica IL28B

y la respuesta al tratamiento con Peg-INF y RVB. Los genotipos encontrados para este polimorfismo fueron 3, C/C, T/T y T/C. Pacientes con el genotipo C/C presentaban una mayor respuesta viral mantenida (SVR) que los otros genotipos (T/T y C/T). Los efectos de los genotipos de IL28B en la SVR fue significativo y más aparente al comparar los individuos homocigotos para el SNP rs12979860 CC con los heterocigotos y los homocigotos T/T. Respecto a los polimorfismos encontrados en LDLR, el SNP analizado fue rs14158, en el cual, los dos nucleótidos eran A/T. En este caso los polimorfismos en este SNPs presentaron relación con la SVR ni con la respuesta al tratamiento, pero si con características citológicas de la enfermedad. Pacientes con el genotipo A/A eran más propensos a presentar esteatosis hepática y valores más bajos en su índice de masa corporal que pacientes heterocigotos A/T y homocigotos T/T.

Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de determinadas moléculas en la entrada de HCV en el hígado, entre ellas LDLR, la importancia de el desarrollo de herramientas biológicas, como las pseudopartículas virales y la importancia de el estudio no solo a nivel funcional y estructural de las moléculas que intervienen en la entrada del virus en los hepatocitos, sino también genético, para determinar haplogrupos que presenten características diferenciales o protección frente a la entrada de HCV, permitiendo desarrollar estrategias de diagnóstico y de tratamiento más personalizadas y con mayores tasas de éxito.

Los resultados de este trabajo de momento no esclarecen el papel de LDLR en la entrada de HCVpp de los diferentes genotipos del virus, puesto que solo se han conseguido la amplificación y clonación de las glicoproteínas de la envuelta de uno de los genotipos, el 3, sin embargo con una mayor cantidad de medios y tiempo se obtendrán mayores resultados, los cuales, seguro aportaran nueva información y complementaran el conocimiento ya obtenido por los estudios mencionados anteriormente.

Referencias Bibliográficas.

1. Hussain Syed G, Amako Y, Siddiqui A, et al. Hepatitis C Virus Hijacks Host Lipid Metabolism. TEM 2010;1:21-33.
2. Hussain Syed G, Tang AH, March MK, et al. Hepatitis C Virus Stimulates Low-Density Lipoprotein Receptor Expression To Facilitate Viral Propagation. J Virol 2014;88:2519–2529.

3. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, et al. Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated from Human Carriers. *J Virol* 1991;1105-1113.
4. Monazahian M, Böhm I, Bonk I, Koch A. Low Density Lipoprotein Receptor as a Candidate Receptor for Hepatitis C Virus. *J Med Virol* 1999;57:223–229.
5. MP Busch. Insights into the epidemiology,natural history and pathogenesis of hepatitisC virus infection from studies of infected donors and blood product recipients. *Transfus Clin Biol* 2001;8:200-6.
6. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of Hepatitis C Virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.
7. Chevaliez S and Pawlotsky JM. HCV Genome and Life Cycle.
8. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J. Gastroenterol* 2007;17: 2406-2415.
9. Vercauteren K, Atef Mesalam A, Leroux-Roels G, et al. Impact of lipids and lipoproteins on hepatitis C virus infection and virus neutralization. *World J. Gastroenterol* 2014;43:15975-91.
10. Echevarría JM, León P, Pozo F. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996-2004). *J. Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;1:20-5.
11. Nalini K, Sharma MD and Averell HS, et al. Epidemiology, Risk Factors, and Natural History of Chronic Hepatitis C *Clin Gastroenterol Hepatol*.
12. Buti M, Franco A, Carmona I, et al. Profiles and clinical management of hepatitis C patients in Spain. *Rev Esp Quimioter* 2015;3:145-153.
13. Bruggmann P, Berg T, Øvrehus A. L. H., et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *J Viral Hepat* 2014;21,(Suppl. 1): 5–33.

14. Felmlee JD, Lamine Hafirassou M, Lefevre M, et al. Hepatitis C Virus, Cholesterol and Lipoproteins — Impact for the Viral Life Cycle and Pathogenesis of Liver Disease . *Virus Res* 2013;5:1292-1324.
15. Lonardo A, Adinolfi LE, Restivo L, et al. Pathogenesis and significance of hepatitis C virus steatosis: An update on survival strategy of a successful pathogen. *World J. Gastroenterol* 2014;23:7089-7103.
16. Zhu YZ, Qian XJ, Zhao P. How hepatitis C virus invades hepatocytes: The mystery of viral entry. *World J. Gastroenterol* 2014;13:3457-3467.
17. Bartosch B, Vitelli A, Granier C, et al. Cell Entry of Hepatitis C Virus Requires a Set of Co-receptors That Include the CD81 Tetraspanin and the SR-B1 Scavenger Receptor. *J Biol Chem.* 2003;43:41624–41630.
18. Lavillette D, W.tarr A, Voisset C, et al. Caracterización of Host-Rage and Cell Entry Propieties of the Major Genotypes and Subtipos of Hepatitis C Virus. *Hepatology* 2005.
19. Stratacloning PCR cloning kit. Catalog #240205.Revision C.0.
<http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/240205.pdf>
20. Caruz A, Neukam K, Rivero-Juárez A, et al. Association of Low-density lipoprotein receptor genotypes with hepatitis C viral load. *Genes Immun* 2014 16-24.
21. Ramos Gómez M, Martínez-Serrano A. Curso de cultivos celulares. Universidad Autónoma de Madrid 2008.
22. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL, et al. A Model for the Study of Hepatitis C Virus Entry. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-envelope protein complexes. *JEM* 2003;197:633-642.

23. Shrivastasa S, Steele R, Ray R, Ray RB. MicroRNAs: Role in hepatitis C virus pathogenesis. *Genes Dis* 2015;2:35-45.
24. A Ashfaq U, Qasim M, Yousaf MZ, et al. Inhibition of HCV 3a genotype entry through Host CD81 and HCV E2 antibodies. *J. Transl. Med.* 2011;9-194.
25. Matas M, Picornell A, Cifuentes C, et al. Relating the outcome of HCV infection and different host SNP polymorphisms in a Majorcan population coinfectd with HCV–HIV and treated with pegIFN-RBV. *Int. Microbiol.* 2014;17:11-20.
26. Dubuisson J, Cosset FL , et al. A Model for the Study of Hepatitis C Virus Entry. Infectious hepatitis Cvirus pseudo-particles containingfunctionalE1-E2 envelope protein complexes. *JEM* 2003;197:633-642.
27. Bartosch B, Dubuisson J and Cosset FL. Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *JEM* 2003;5:633–642.
28. Bergera A, Girogloub T, Leutza A, et al. Measurements of HCV neutralizing antibodies and of HCV-specific CD4+ and CD8+ cells using hepatitis C virus pseudo-particles (HCVpp). *J Clin Virol* 2009;55–60.
29. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-1324.
30. Hsu M, Zhang J, Flint M, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *PNAS* 2003;100:7271-7276.
31. Jones DM, McLauchlan J. Hepatitis C virus: Asembly and release of virus particles. *J Biol Chem* 2010;285:22733-22739.
32. Rivero-Juárez A, Camacho A, Caruz A, et al. LDLr genotype modifies the impact of IL28B on viral kinetics after the first weeks of treatment with PEG-INF/RBV in HIV/HCV patients. *AIDS* 2012;26:1009-1015.