

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EFECTO DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE HEPATITIS C EN LA  
REGULACIÓN DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL Y  
ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS.

Por

M.C. TANIA GUADALUPE HEREDIA TORRES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

Julio, 2024

EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS DEL VIRUS DE HEPATITIS C EN LA  
REGULACIÓN DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL Y  
ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS.

Comité de Tesis



---

Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla  
Directora de tesis



---

Dra. C. Paula Cordero Pérez  
Co-directora de tesis



---

Dra. C. Ana Rosa Rincón Sánchez  
Miembro de la comisión



---

Dra. C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda  
Miembro de la comisión



---

Dra. C. Aurora de Jesús Garza Juárez  
Miembro de la comisión



---

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Sub-director de estudios de posgrado

## **LUGAR DE TRABAJO Y DIRECCIÓN DE TESIS**

El presente proyecto se llevó a cabo en el Centro de Investigación e Innovación en Virología Médica del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección de la Dra. Ana María G. Rivas Estilla.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco plenamente a todas las personas e instituciones que me apoyaron desde el inicio con la realización de este proyecto de investigación para obtener el grado académico de Doctora en Ciencias con orientación en biología molecular e ingeniería genética.

Gracias a la **Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla** por permitirme desarrollar este trabajo bajo su dirección. Agradezco su disciplina, liderazgo, comprensión y disposición. Gracias por todo su apoyo a nivel educativo, académico, profesional y personal. Me enseñó a ser una persona visionaria y lograr superarme en varios aspectos durante mi formación académica y profesional.

Gracias a mi comité de tesis conformado por la **Dra. C. Paula Cordero Pérez**, la **Dra. C. Ana Rosa Rincón Sánchez**, la **Dra. C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda** y a la **Dra. C. Aurora de Jesús Garza Juárez** por su enriquecimiento profesional en el desarrollo del proyecto de tesis.

Gracias al **Laboratorio Nacional Biobanco** de la Facultad de Medicina, UANL, por las facilidades otorgadas para el uso del equipo de PCR en tiempo real que fue indispensable para la realización del trabajo de investigación.

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico brindado para la realización y manutención de mis estudios de posgrado. Asimismo, agradezco al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (**PAICYT**) y al Programa de Apoyo a la ciencia, tecnología e innovación (**PRoACTI**) por el apoyo económico otorgado para la realización del proyecto.

Gracias al todo el personal del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, en especial a Violeta, Laura, Vicky, Juani y Deyanira porque definitivamente, sin todo su apoyo no habría logrado llevar cada etapa del proceso académico y profesional al que me enfrentaba.

Muchas gracias a mis compañeros de **CIIViM**, Jonatan, Tadeo, César, Liz, Katya, Franco, Pedro, Katia y Karen por su valioso apoyo en aspectos técnicos y estandarización de protocolos necesarios para el desarrollo del proyecto. En especial, agradezco a **Cynthia Martínez, Verónica Alvarado, Alí Ruiz, Julio Garza y Daniel Hernández** por generar un incomparable ambiente de trabajo. Asimismo, agradezco por brindarme su valiosísima amistad que se volvió uno de mis pilares durante este tiempo.

Agradezco también a la **Dra. Sonia Lozano** por toda su enseñanza a nivel académico, profesional y personal, porque su objetividad y capacidad de análisis me inspiran para ser mejor persona y científica. Por compartir conmigo su experiencia a nivel experimental tan necesaria para el trabajo en laboratorio. Asimismo, agradezco al **Dr Daniel Arellanos** por su apoyo y consejos a nivel académico y profesional, por guiarme y apoyarme siempre con cualquier cosa que estuviera en sus manos. Al **Dr Kame Galán** por siempre tener las palabras adecuadas en el momento que más las necesitaba, por hacerme disfrutar y ver las cosas que realmente importan y porque siempre sabía cómo hacerme mantener la calma en mis momentos de locura.

Gracias a mis compañeros de generación de doctorado, Adriana y Samuel por brindarme su apoyo a lo largo del programa académico. A las amistades que tuve la oportunidad de formar en el posgrado, como la de **Pablo Carriquiry, Daniel Caba** y en especial, la de **Martin Gerardo García Juárez** que se hizo indispensable durante todo este periodo, gracias por esas pláticas y

risas tan necesarias para sobrellevar tanto los buenos como los malos momentos. Gracias por compartir conmigo este camino que no fue nada fácil para ninguno de los dos. Gracias por todos esos momentos de locura y de diversión, pero también gracias por esas pláticas tan terapéuticas. Finalmente, muchísimas gracias porque sin ti, esto simplemente no hubiera sido lo mismo.

Gracias a **Larli Pérez** por su amistad y compañía tan inesperada y enriquecedora. Por llegar a mi vida cuando, al parecer, más lo necesitaba y por compartir conmigo los momentos más difíciles para poder culminar esta etapa tan complicada en mi vida.

Gracias a la **Dra Ana Villarreal** por todo el apoyo psiquiátrico brindado en la última etapa de mi doctorado, por su motivación, por sus enseñanzas y porque sin todo su apoyo simplemente no habría podido terminar este proyecto.

Gracias a mis amigos/hermanos **Pedro Avitia, Edeer Montoya y Sergio Romo** por estar conmigo siempre, tener las palabras adecuadas en el momento indicado, por su amistad incondicional durante tantos años y por hacerme ver que los verdaderos amigos están contigo incluso en los días más difíciles. Finalmente, gracias por formar parte de esa familia que uno escoge.

Gracias a **Cristian Moreno** por su cariño, sinceridad, confianza, compañía y apoyo tan necesarios durante esta etapa de mi vida, gracias por motivarme y enseñarme a ver la vida de otra manera. Gracias por todos esos momentos de diversión y plenitud que me hicieron amar y disfrutar la naturaleza.

Gracias al pilar más grande, mi familia, por su apoyo, cariño y enseñanza incondicional. A mis padres, **Homero Heredia y Carmen Torres**, por brindarme todo lo necesario para llegar hasta este punto. Por seguir impulsando y apoyando mi crecimiento personal y académico a pesar del tiempo, la distancia y la salud. A mis hermanos, **Ana Perla Heredia** por enseñarme a tener coraje y fuerza para cuando más lo requiera y a **David Heredia** por enseñarme a seguir esforzándome cada día para lograr mis objetivos. A **Dominga, Alicia, Isidra, Concepción y Margarita** por demostrarme que vivir es aprender y disfrutar de todo momento. Que, a pesar de las pérdidas, lo que importa es lo que logras llevarte en la mente y en el corazón. Que siempre se puede volver a ser feliz todos los días a pesar de las adversidades. En fin, a toda mi familia humana y canina, por siempre guiarme por el camino adecuado, y por ayudar a encontrarme cuando me salgo de él, por enseñarme a respetar, perdonar y amar a pesar de las dificultades.

Gracias a la vida por brindarme la salud y la fortaleza necesaria para no rendirme, para haber llegado hasta este punto y para lograr sobrellevar día a día este proyecto que más que una meta se convirtió en toda una enseñanza de vida.

## DEDICATORIA

A mí misma,

Con mucha humildad, gratitud y mucho amor, dedico esta tesis a mi ser, a la persona que fui y soy hoy. Este viaje académico ha sido más que un proceso de aprendizaje; ha sido un camino de autodescubrimiento y crecimiento personal. A través de cada desafío, cada logro y cada momento de duda, he estado aprendiendo a amarme y aceptarme plenamente.

Este trabajo representa no solo el fruto de años de estudio y dedicación, sino también el símbolo de mi transformación y mi constante evolución.

Gracias a mí misma por no rendirme, por creer en mis sueños y por encontrar siempre la luz en medio de la oscuridad. Este logro es un homenaje a mi resiliencia, mi pasión y mi amor propio.

*Como el fénix. Consumirse en un fuego ardiente, para renacer de las cenizas,  
transformado y enriquecido por la sabiduría adquirida.*

## ÍNDICE

	pág.
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	18
2.1. Hepatitis C	18
2.1.1. Epidemiología	18
2.1.2. Vías de transmisión y personas de riesgo	22
2.1.3. Agente etiológico	23
2.1.3.1. Características genotípicas	23
2.1.3.1.1. Proteínas virales	24
2.1.3.1.2. Ciclo de replicación	27
2.1.4. Cuadro clínico	30
2.1.5. Tratamiento	30
2.1.6. Complicaciones	32
2.1.7. Patogénesis	33
2.1.8. Mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis inducida por el VHC.	34
2.1.8.1. Transición epitelial mesenquimal	35
2.1.8.2. Activación de células estelares hepáticas (CEH)	39
2.1.8.3. Inhibidor 1 del activador del plasminógeno en la enfermedad hepática	41
2.1.8.4. Participación del VHC en la Inducción de la TEM, activación de CEH y regulación de PAI-1.	43
3. JUSTIFICACIÓN	45
4. HIPÓTESIS	46
5. OBJETIVOS	47
6. METODOLOGÍA	48
6.1. Estrategia experimental	48
6.2. Diseño, producción y caracterización de plásmidos	48
6.3. Subcultivos celulares	50
6.4. Actividad biológica de <i>Vaccinia Virus</i> en células Huh-7.	50
6.5. Transfección transitoria de los plásmidos en células Huh-7	51
6.6. Ensayo de viabilidad celular	52
6.7. Ensayo de cicatrización de herida	52

6.8.	Extracción del ARN total	54
6.9.	Evaluación de expresión génica mediante RT-qPCR	55
6.10.	Cálculo de número de copias de NS5A y Core del VHC	57
6.11.	Extracción de proteína total	58
6.12.	Cuantificación de proteínas	59
6.13.	Evaluación de expresión proteica mediante Western Blot	60
6.14.	Evaluación de expresión proteica mediante la actividad de Nano Luciferasa	62
6.15.	Co-cultivo de células Huh-7 y LX-2	63
6.16.	Evaluación de expresión génica mediante el arreglo de RT-qPCR	64
6.17.	Análisis bioinformáticos de genes diferencialmente expresados	67
6.18.	Silenciamiento de PAI-1 en células Huh-7	68
6.19.	Inhibición de la actividad de PAI-1 en células Huh-7	69
7.	<b>RESULTADOS</b>	70
7.1.	Diseño y caracterización de plásmidos	70
7.2.	Sistema de expresión transitoria de las proteínas NS5A y Core del VHC.	71
7.3.	Expresión de marcadores de la Transición Epitelial-Mesenquimal inducidos por la proteína NS5A y Core del VHC.	76
7.4.	Capacidad de migración inducida por la proteína NS5A y Core del VHC en células Huh7.	79
7.5.	Activación de células estelares hepáticas LX2 inducida por el co-cultivo con células Huh7 que expresan la proteína NS5A y Core del VHC.	81
7.6.	Perfil de expresión génica asociado a procesos de fibrosis inducido por las proteínas NS5A y Core del VHC en células Huh7 durante el co-cultivo con células estelares hepáticas.	84
7.7.	Enriquecimiento de vías moleculares y ontología de genes inducido por las proteínas NS5A y Core del VHC en células Huh7 durante el co-cultivo con células estelares hepáticas LX2.	91
7.8.	Participación del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) en la TEM durante la expresión de las proteínas NS5A y Core del VHC en células Huh7.	96
8.	<b>DISCUSIÓN</b>	104
9.	<b>CONCLUSIONES</b>	109
10.	<b>PERSPECTIVAS</b>	110
11.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	111
12.	<b>ANEXOS</b>	134



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Condiciones para la caracterización de plásmidos mediante cortes con enzimas de restricción.....	49
Tabla 2 Reactivos para la transfección transitoria mediante lipofección.....	51
Tabla 3 Reactivos y condiciones para la retrotranscripción del ARN.....	55
Tabla 4 Reactivos para la qPCR a partir del cDNA.....	56
Tabla 5 Condiciones para la qPCR.....	56
Tabla 6 Datos de los estándares para el cálculo de número de copias.....	58
Tabla 7 Cantidades para preparar los estándares de curva de cuantificación.....	59
Tabla 8 Reactivos y condiciones para la retrotranscripción del arreglo de qPCR..	66
Tabla 9 Reactivos para el arreglo de qPCR.....	66
Tabla 10 Condiciones para el arreglo de qPCR.....	66
Tabla 11 Reactivos para la transfección de silenciamiento mediante lipofección....	69
Tabla 12. Electroforesis en gel correspondiente a la caracterización de plásmidos.	71
Tabla 13. Genes asociados a fibrosis diferencialmente expresados en células NS5A Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y co-cultivadas con LX2.....	87
Tabla 14. Genes asociados a fibrosis diferencialmente expresados en células Core-Huh7 transfectadas con pCore/HCV y co-cultivadas con LX2 durante 48 horas. ..	89
Tabla 15. Genes asociados a fibrosis diferencialmente expresados en células Core-Huh7 transfectadas con pCore-NS5A/HCV y co-cultivadas con LX2 durante 72 horas. ....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
<b>Figura 1. Nuevas infecciones y mortalidad por hepatitis B y C por región de la OMS, 2019.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2. Distribución de genotipos del VHC en México .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3. Organización genética y procesamiento de la poliproteína del VHC. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 4. Distribución mundial de Genotipos y subtipos del virus de hepatitis C...25</b>	
<b>Figura 5. Ciclo de replicación del VHC. ....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 6. Algoritmo resumido para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la infección crónica por el VHC en adultos y adolescentes. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 7. Progresión de las complicaciones causadas por la infección con VHC. ...</b>	<b>33</b>
<b>Figura 8. Mecanismos moleculares implicados en la progresión de la hepatocarcinogénesis inducida por la infección por VHC. ....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 9. Principales cambios celulares durante la transición epitelial mesenquimal. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 10. Vías moleculares que desencadenan la TEM durante el desarrollo y la progresión del CHC. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 11. Funciones, características y fenotipos de las CEH en la fase de iniciación y perpetuación durante la activación de células estelares hepáticas. [11] .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 12. regulación de la activación de PAI-1 y su papel en los hepatocitos. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 13. Estrategia experimental general del proyecto. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 14. Ejemplo del procesamiento de las micrografías para la determinación del porcentaje de cicatrización.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 15. Esquema del ensayo de co-cultivo. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 16. Diseño de la placa del <i>Human Fibrosis PAHS-120ZA RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array</i>. ....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 17. Diseño y caracterización <i>in silico</i> de los plásmidos.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 18. Caracterización de plásmidos pNLuc-NS5A/HCV y pCore/HCV.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 19. Actividad biológica del <i>Vaccinia Virus</i> en células Huh-7.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 20. Viabilidad de Huh7 a las 96 horas de transfección mediante lipofección. ....</b>	<b>73</b>

<b>Figura 21. Curva estándar de plásmidos pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV .....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 22. Expresión de Nluc-NS5A/HCV y Core/HCV a distintos tiempos de transfección en células Huh7. ....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 23. Expresión de biomarcadores de la transición epitelial mesenquimal en células Huh7-NS5A a las 24 y 48 horas de transfección con pNluc-NS5A/HCV.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 24. Expresión de biomarcadores de la transición epitelial mesenquimal en células Huh7-NS5A a las 24 y 48 horas de transfección con pCore/HCV. ....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 25. Capacidad de migración inducida por la proteína NS5A y Core del VHC en células Huh7.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 26. Porcentaje de la capacidad de migración inducida por la proteína NS5A y Core del VHC en células Huh7. ....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 27. Efecto de NS5A sobre la regulación de biomarcadores de activación de HSC en células LX2. ....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 28. Efecto de <i>Core</i> sobre la regulación de biomarcadores de activación de HSC en células LX2.. ....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 29. Gráficos de volcán destacando los genes diferencialmente expresados en las células Huh7 después de 48 y 72 horas de co-cultivo con células LX2.. ....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 30. Regulación de la expresión de genes relacionados con la fibrosis en Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y co-cultivadas con células LX2.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 31. Regulación de la expresión de genes relacionados con la fibrosis en Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y co-cultivadas con células LX2.....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 32. Análisis de enriquecimiento de GDE inducidos por la expresión de NS5A/HCV en Huh7 co-cultivadas con células LX2.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 33. Análisis de enriquecimiento de GDE inducidos por la expresión de Core/HCV en Huh7 co-cultivadas con células LX2.. ....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 34. Análisis de las redes de interacción proteína-proteína de los GDE inducidos por la expresión de NS5A/HCV en Huh7 co-cultivado con células LX2 durante 48 horas.....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 35. Análisis de las redes de interacción proteína-proteína de los GDE inducidos por la expresión de NS5A/HCV en Huh7 co-cultivado con células LX2 durante 72 horas.....</b>	<b>94</b>

<b>Figura 36. Análisis de las redes de interacción proteína-proteína de los GDE inducidos por la expresión de Core/HCV en Huh7 co-cultivado con células LX2 durante 48 horas.....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 37. Análisis de las redes de interacción proteína-proteína de los GDE inducidos por la expresión de Core/HCV en Huh7 co-cultivado con células LX2 durante 72 horas.....</b>	<b>95</b>
<b>Figura 38. Efecto del siPAI-1 sobre la viabilidad de células Huh7 a las 48 y 72 horas de transfección.....</b>	<b>96</b>
<b>Figura 39. Expresión de PAI-1 en células Huh7 a las 24, 48 y 72 horas de silenciamiento. ....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 40. Expresión de biomarcadores de la TEM en células Huh7-NS5A a las 24 y 48 horas de transfección con siPAI-1. ....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 41. Expresión de biomarcadores de la TEM en células Huh7-Core a las 24 y 48 horas de transfección con siPAI-1. ....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 42. Efecto del TM5275 sobre la viabilidad de células Huh7 a las 48 y 72 horas de tratamiento. ....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 43. Expresión de biomarcadores de la TEM en células Huh7-NS5A a las 24 y 48 horas de tratamiento con TM5275. ....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 44. Expresión de biomarcadores de la TEM en células Huh7-Core a las 24 y 48 horas de tratamiento con TM5275. ....</b>	<b>103</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AAD	Antivirales de acción directa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
°C	Grados centígrados
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
CEH	Célula estelar hepática
CSC	Células madre cancerosas
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
kDa	Kilodaltones
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
h	Horas
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
g	Gramos
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
LB	Luria Bertani
MEC	Matriz Extracelular
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
M	Molar

$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitros
ng	Nanogramos
nM	Nanomolaridad
NS5A	Proteína no estructural 5A del VHC
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	del inglés Phosphate buffered solution
PCR	del inglés Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	PCR cuantitativa
PKR	Proteína quinasa R
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RVS	Respuesta virológica sostenida
RT	Transcripción reversa
TEM	Transición epitelial mesenquimal
UV	Ultravioleta
V	Volts
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Wb	Western blot
SDS	Dodecil sulfato de sodio

## RESUMEN

**Introducción:** La infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC) conduce al desarrollo de fibrosis mediada por la comunicación intercelular entre las células estelares hepáticas (CEH) y los hepatocitos infectados. El VHC puede promover la activación de las CEH aumentando la expresión de Col1,  $\alpha$ SMA y TIMPs, y promover la transición epitelial-mesenquimal (TEM) de los hepatocitos mediante la regulación de Snail, TGF $\beta$ 1 y E-cadherina. Se ha demostrado que el inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) puede estar involucrado en procesos de fibrosis hepática. Sin embargo, aún no se han determinado las vías moleculares durante estos procesos celulares mediada por la infección viral. **Objetivo:** Estudiar los mecanismos moleculares de fibrosis involucrados en la transición epitelial mesenquimal y activación de células estelares hepáticas (LX2) inducidos por la proteína NS5A y Core del VHC. **Métodos:** Células Huh7 fueron transfectadas con pNluc-NS5A/VHC y pCore/HCV durante 24 y 48 h. La expresión de NS5A y Core se determinó mediante la actividad de nanoluciferasa y Western Blot, respectivamente. La TEM de Huh7 se evaluó mediante la expresión relativa de Snail, TGF $\beta$ 1 y E-cadherina y mediante el ensayo de cicatrización de herida. Asimismo, las células Huh7 transfectadas fueron co-cultivadas con células LX2 utilizando placas con insertos de transwell. La activación de LX2 se determinó mediante la expresión relativa de TGF $\beta$ 1, Col1,  $\alpha$ SMA y TIMP1 después de 48 y 72 horas de co-cultivo. La expresión de 84 genes asociados con vías moleculares inductoras de fibrosis en Huh7 transfectadas y co-cultivadas con LX2 se evaluó mediante el arreglo de qPCR RT<sup>2</sup> de fibrosis humana. La participación de PAI-1 se evaluó mediante el silenciamiento y mediante la inhibición con el TM5275 y evaluando los marcadores de TEM. **Resultados:** La expresión de las proteínas NS5A y Core del VHC en células Huh7 promovió la migración celular, sobreexpresión de TGF $\beta$ 1 y Snail, y subexpresión de E-cadherina, sugiriendo la TEM. En co-cultivo se indujo a la sobreexpresión de TGF $\beta$ 1, Col1 $\alpha$ 1 y Timp1 en CEH-LX2. El perfil génico de Huh7 en co-cultivo mostró 23 genes diferencialmente expresados en común, como posibles blancos moleculares, entre ellos PAI-1. La inhibición de PAI-1 moduló la expresión de TGF $\beta$ 1, Vimentina y E-cadherina, implicándolo en la regulación de la TEM, aunque este efecto no se vio en presencia de NS5A o Core, indicando su capacidad moduladora. Los genes inducidos por NS5A y Core en Huh7 co-cultivadas con LX2 se asociaron principalmente a la señalización de TGF $\beta$ 1 y la organización de la matriz extracelular. **Discusión:** La TEM de hepatocitos y la activación de CEH inducidas por proteínas del VHC ya había sido asociado antes. Sin embargo, a pesar de la relación de PAI-1 en procesos de fibrosis hepática, la participación de PAI-1 en la TEM de Huh7 inducida por el VHC no había sido estudiado. Nuestros resultados sugieren que, durante estos dos procesos, se regulan diversos genes asociados con vías moleculares inductoras de fibrosis, como la de PAI-1 y que las proteínas virales, a su vez podrían estar modulando cualquier actividad inhibitoria de PAI-1. **Conclusión:** La expresión de NS5A y Core pueden inducir la TEM de Huh7 y la activación de LX2 en co-cultivo, lo que regula diversos genes, entre ellos PAI-1, que al ser inhibido puede revertir biomarcadores de la TEM de Huh7. Sin embargo, también se demostró que NS5A y Core pueden modular la inhibición de PAI-1. Estudiar los mecanismos moleculares durante la comunicación intercelular asociados a la fisiopatología de la fibrosis desencadenada por el VHC es de gran importancia ya que repercutirá en la identificación y elección de nuevos blancos moleculares asociados a las terapias antifibróticas.



---

Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla  
Directora de tesis

## ABSTRACT

**Introduction:** Chronic infection by the hepatitis C virus (HCV) leads to the fibrosis development mediated by intercellular communication between hepatic stellate cells (HSCs) and infected hepatocytes. HCV can promote HSC activation by increasing the expression of Coll,  $\alpha$ SMA, and TIMPs, and promote the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of hepatocytes through the regulation of Snail, TGF $\beta$ 1, and E-cadherin. It has been shown that plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) may be involved in liver fibrosis. However, the molecular pathways during these virus-mediated cellular processes have not yet been determined. **Objective:** To study the molecular mechanisms of fibrosis involved in epithelial-mesenchymal transition and hepatic stellate cell (LX2) activation induced by HCV NS5A and Core proteins. **Methods:** Huh7 cells were transfected with pNluc-NS5A/HCV and pCore/HCV for 24 and 48 hours. The expression of NS5A and Core was determined by nanoluciferase activity and Western Blot, respectively. EMT of Huh7 was evaluated by the relative expression of Snail, TGF $\beta$ 1, and E-cadherin and by wound healing assay. Additionally, transfected Huh7 cells were co-cultured with LX2 cells using transwell insert plates. The activation of LX2 was determined by the relative expression of TGF $\beta$ 1, Coll,  $\alpha$ SMA, and TIMP1 after 48 and 72 hours of co-culture. The expression of 84 genes associated with molecular pathways inducing fibrosis in transfected and co-cultured Huh7 cells was evaluated using the human fibrosis RT<sup>2</sup> qPCR array. The involvement of PAI-1 was assessed by silencing it using siRNA, by inhibition with TM5275, and evaluating EMT markers. **Results:** The expression of HCV NS5A and Core proteins in Huh7 cells promoted cell migration, overexpression of TGF $\beta$ 1 and Snail, and subexpression of E-cadherin, suggesting EMT. In co-culture, overexpression of TGF $\beta$ 1, Coll $\alpha$ 1, and Timp1 was induced in LX2-HSCs. The gene profile of Huh7 in co-culture showed differentially expressed genes in common, as potential molecular targets, including PAI-1. Inhibition of PAI-1 modulated the expression of TGF $\beta$ 1, Vimentin, and E-cadherin, implicating it in the regulation of EMT, although this effect was not seen in the presence of NS5A or Core, indicating their modulatory capacity. Genes induced by NS5A and Core in Huh7 co-cultured with LX2 were mainly associated with TGF $\beta$ 1 signaling and extracellular matrix organization. **Discussion:** The EMT of hepatocytes and activation of HSCs induced by HCV proteins had been previously associated. However, despite the relation of PAI-1 in liver fibrosis processes, the involvement of PAI-1 in HCV-induced EMT of Huh7 had not been studied. Our results suggest that, during these two processes, various genes associated with fibrosis-inducing molecular pathways, such as PAI-1, are regulated, and that viral proteins could be modulating any inhibitory activity of PAI-1. **Conclusion:** NS5A and Core proteins expression can induce EMT in Huh7 and activation of LX2 in co-culture, regulating diverse genes, including PAI-1, which when inhibited can reverse EMT biomarkers of Huh7. However, it was also shown that NS5A and Core can modulate PAI-1 inhibition. Studying the molecular mechanisms during intercellular communication associated with the pathophysiology of fibrosis triggered by HCV is of great importance as it will impact the identification and selection of new molecular targets associated with antifibrotic therapies.



---

Dra. C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla  
Directora de tesis



# 1. INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una enfermedad del hígado causada por el virus de la hepatitis C (VHC) caracterizada por inflamación del tejido hepático. La infección puede ser aguda o crónica y puede producir desde síntomas subclínicos, hasta síntomas graves y posteriormente inducir muerte después de un curso crónico de más de 10 años. Globalmente, se estima que 50 millones de personas tienen infección crónica de VHC. Además, en 2019 se asociaron alrededor de 242,000 muertes a causa de cirrosis y carcinoma hepatocelular inducido por infección con el VHC (World Health Organization, 2024)

Alrededor de un 75-85% de las personas infectadas con el VHC llegan a una etapa de infección crónica de por vida. La inflamación prolongada del hígado debido a la infección, provoca la aparición de enfermedades como fibrosis hepática, cirrosis compensada, cirrosis descompensada y finalmente carcinoma hepatocelular (CHC) que puede provocar la muerte (Gower et al., 2014).

Después de que el VHC infecta una célula, el genoma viral codifica para la producción de una poliproteína, la cual al ser escindida produce tres proteínas estructurales (Core, E1 y E2) y siete proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) las cuales participan en el ciclo de replicación y patogénesis de la enfermedad (Bukh, 2016).

Se han desarrollado fármacos llamados antivirales de acción directa (AAD) que ofrecen una tasa de 95% de curación (Dash et al., 2020). Sin embargo, pacientes que presentan complicaciones hepáticas en el momento del tratamiento con AAD se enfrentan al riesgo de aparición y recurrencia de CHC después de la resolución viral (Ioannou et al., 2019; Nahon et al., 2018; Nakano et al., 2019; Piñero et al., 2019).

No se considera que el VHC sea directamente oncogénico, se piensa que la infección con VHC crea un microambiente tumorigénico que promueva la transformación celular. En la progresión al CHC, la transición epitelial mesenquimal de los hepatocitos, la activación de células estelares hepáticas (CEH), entre otros, juegan un rol muy importante desde el desarrollo inicial de fibrosis hasta la metástasis del CHC (Irshad et al., 2017)

Cabe destacar que la infección con VHC *in vitro* en cultivo de células ha demostrado la inducción de la transición epitelial mesenquimal (TEM) en hepatocitos, a su vez, la infección puede desencadenar la activación de las CEH. Una vez que los hepatocitos y las CEH se convierten adquieren un fenotipo de miofibroblastos son capaces de inducir la producción y degradación continua de la matriz extracelular (MEC) (S. J. Lee et al., 2014) que finalmente promueve al desarrollo de la fibrosis (Dewidar et al., 2019; Tsuchida and Friedman, 2017). Asimismo, la TEM y activación de CEH continua, y no regulada, puede contribuir a cambios oncogénicos celulares promoviendo el desarrollo del CHC (López-Nouoa and Nieto, 2009; Pinzani, 2011).

La proteína NS5A y la proteína Core del VHC han sido relacionadas con algunas de las vías de señalización que promueven la TEM y activación de CEH. Sin embargo, existen muchas alternativas en la regulación de las vías de señalización implicadas en ambos procesos que aún no han sido exploradas. Ya que el microambiente generado por la infección del VHC y la consecuente activación de la TEM y CEH promueven en gran medida el desarrollo y progresión del CHC, es necesario el estudio de la regulación de la fibrosis en un mismo sistema *in vitro* que nos ayude evaluar un panorama más completo acerca de las interacciones de factores celulares que pudieran generar nuevos conocimientos en el progreso de la infección hacia procesos fibrogénicos y tumorigénicos característicos de la enfermedad. Asimismo, es necesaria la información que permita la identificación de biomarcadores moleculares con potencial uso diagnóstico para prevenir y controlar las diversas complicaciones derivadas de la infección crónica con el VHC.

## 2. ANTECEDENTES

La hepatitis se define como inflamación del tejido hepático. La inflamación puede ser de corto (aguda) y largo (crónica) plazo. La hepatitis crónica puede provocar el desarrollo de fibrosis, seguido por una cirrosis y finalmente el progreso al carcinoma hepatocelular (CHC). La inflamación del hígado puede ser causada por varios factores diferentes: consumo de alcohol, ciertos medicamentos, enfermedad autoinmune, enfermedad del hígado graso e infección viral. Originalmente, la hepatitis viral podía ser de dos tipos: hepatitis infecciosa o tipo A y hepatitis sérica o tipo B. Debido a que no se contaba con métodos de diagnóstico específicos, ambos tipos eran distinguidos por el tipo de transmisión y periodos de incubación, ya que el tipo A se transmite por vía fecal-oral y tiene una incubación corta, por otro lado, el tipo B, es por exposición a sangre percutánea y con prolongado periodo de incubación (Krugman et al., 1967). Sin embargo, en estudios de casos de hepatitis asociados a transfusiones se identificó una “hepatitis no A no B” (Feinstone et al., 2001). Estudios posteriores mostraron que este tipo de hepatitis podría ser causada por un agente etiológico infeccioso (Alter et al., 1978). En 1989 se demostró que el responsable de la hepatitis no A no B, era el ahora denominado virus de hepatitis C (Qui Lim Choo et al., 1989; Houghton, 2019). No obstante, ahora se conocen distintos tipos de virus que pueden causar hepatitis: A, B, C, D y E (Razavi, 2020).

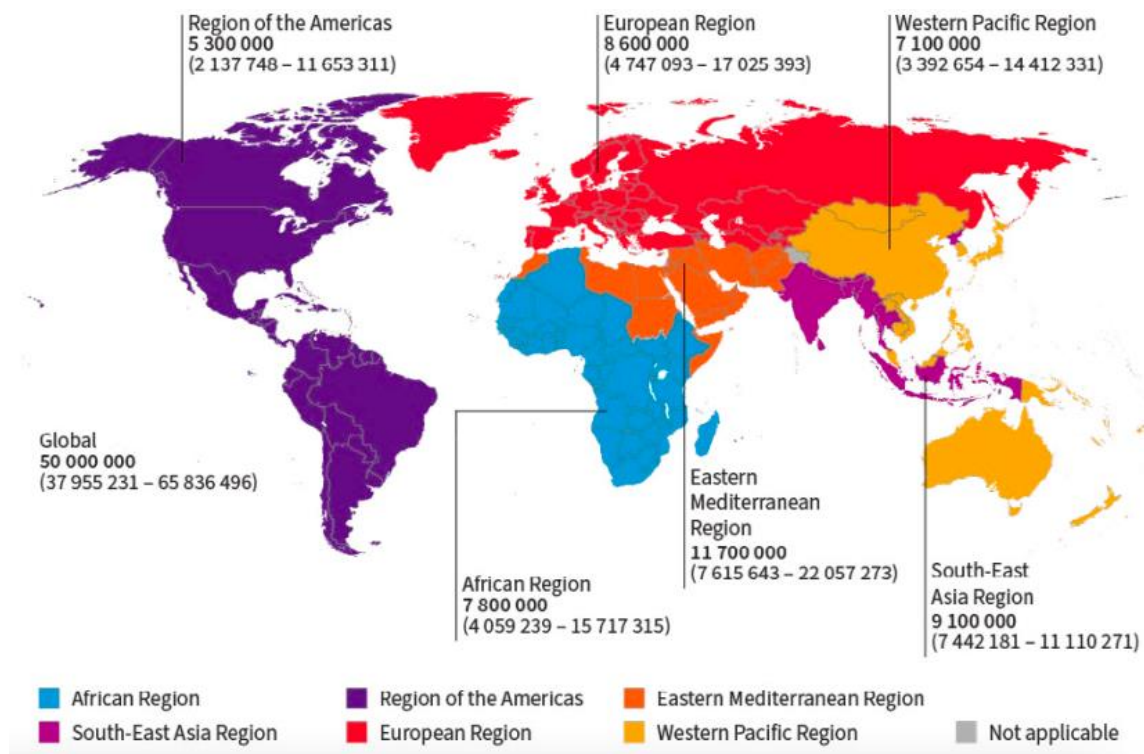
### 2.1. Hepatitis C

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la hepatitis C como una enfermedad del hígado causada por el virus de la hepatitis C (VHC); el virus puede causar hepatitis aguda y/o crónica, cuya gravedad puede ir desde una enfermedad leve con duración de pocas semanas, hasta una enfermedad grave de por vida.

#### 2.1.1. Epidemiología

Globalmente, en 2022 se estimó que alrededor de 50 millones de personas tenían infección crónica con el virus de hepatitis C y se registraron 1.0 millones [0.76 millones–

1.34 millones] de nuevos casos. Asimismo, se estimó que 240,000 [197,000–288,000] personas fallecieron debido a causas relacionadas con la infección en el mismo año. En la **Figura 1** se puede identificar la prevalencia global por regiones reportadas por la OMS en 2022 (World Health Organization, 2024).



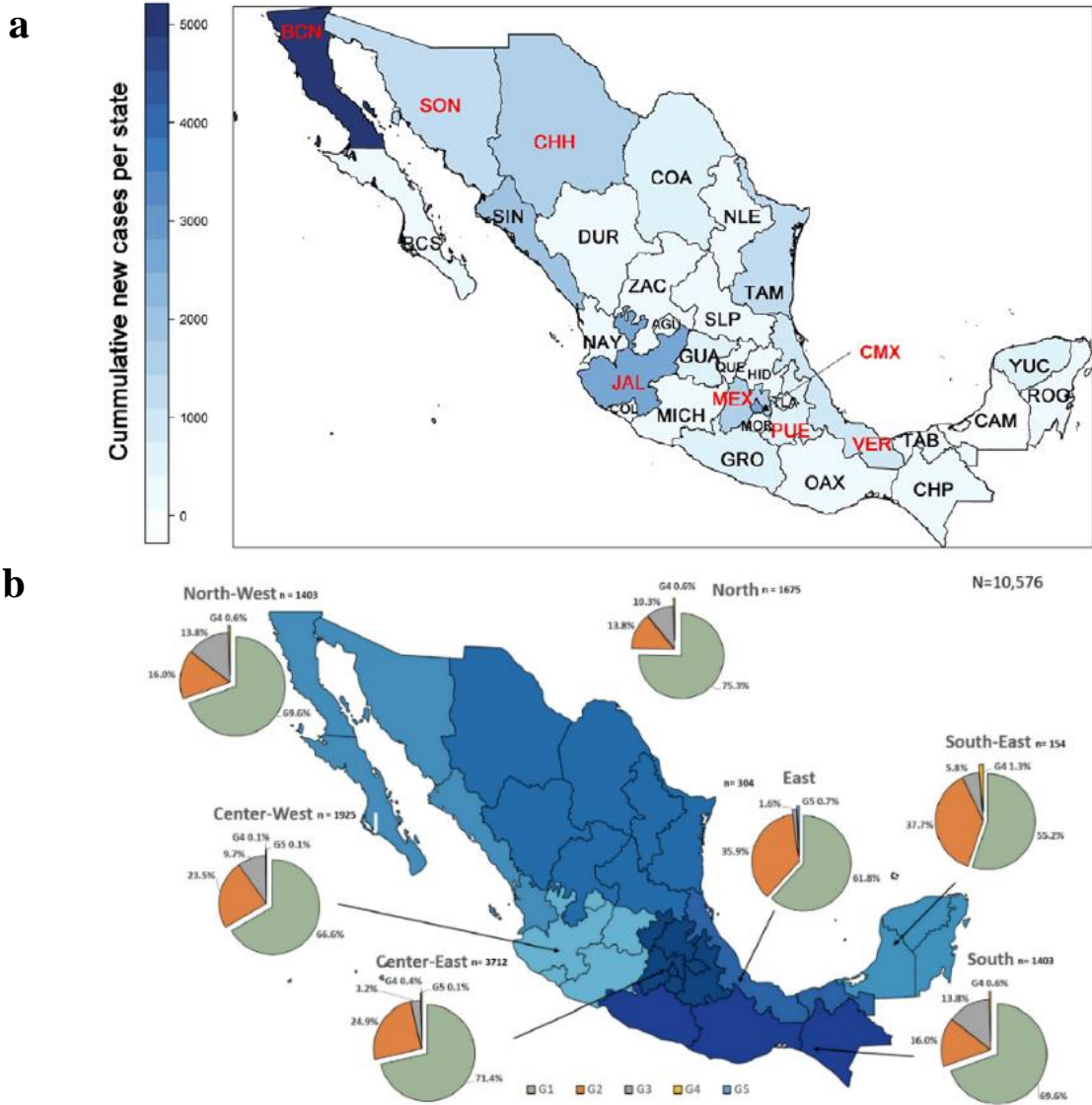
**Figura 1. Prevalencia global por regiones reportadas por la OMS en 2022 (World Health Organization, 2024).**

Asimismo, la Organización Mundial de la Salud, reportó un total de 15.2 millones [11.2 millones–19.0 millones] de personas que vivían con hepatitis C eran conscientes de su estado de la enfermedad en 2019. Cabe destacar que también se reportó que entre 2015 y 2019, alrededor de 9.4 millones [7.5 millones–11.7 millones] de personas que fueron diagnosticadas con la infección por hepatitis C fueron tratadas con medicamentos antivirales de acción directa. Por otro lado, se reportó un estimado de 500,000 nuevos casos de carcinoma hepatocelular que fueron atribuibles a las infecciones por hepatitis B y C (WHO, 2021). Estos datos destacan la magnitud de la carga global de la hepatitis C, resaltando tanto la incidencia de nuevas infecciones como las consecuencias letales y la

importancia de los esfuerzos para el diagnóstico temprano y el tratamiento efectivo de la infección por hepatitis C a nivel mundial.

Por otro lado, en México, según lo reportado en una revisión sistemática y metaanálisis en 2021 por Virginia Sedeño-Monge, durante el periodo comprendido entre 2008 y 2019, se registraron 25,247 nuevos casos de infección por el VHC (Sedeño-Monge et al., 2021). Al analizar la distribución geográfica de estos casos, se destacó la presencia significativa en entidades como Baja California, Ciudad de México, Jalisco, Sinaloa y Estado de México, que en conjunto acumularon el 76.32% de los nuevos casos. El año 2019 se identificó como el de mayor incidencia, evidenciando un pico notable en comparación con los años precedentes. Al desglosar los datos por género, se observó que, en ese año 1,490 casos fueron reportados en hombres, superando a los 859 casos en mujeres, estableciendo una proporción de 73:1. Además, la tasa de incidencia acumulativa por cada 100,000 habitantes alcanzó su punto máximo en hombres del grupo de edad de 50 a 59 años y en mujeres de 60 a 64 años (Sedeño-Monge et al., 2021).

En cuanto a la distribución regional de los genotipos del VHC, se llevaron a cabo análisis principalmente en donantes de sangre, pacientes con infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y aquellos infectados crónicamente con VHC. De las 11,838 muestras analizadas, el 67.74% correspondió al genotipo 1 (GT1), el 21.1% al genotipo 2 (GT2) y el 7.0% al genotipo 3 (GT3). Se detectaron genotipos menos comunes, como GT4 (0.41%) y GT5 (0.05%), así como combinaciones de genotipos (0.44%) y casos no tipificables (3.3%). Dentro de cada genotipo principal, el subtipo 1b se presentó como el más predominante (29.14%), seguido por 1a (17.03%), 2b (8.94%) y 3a (3.65%). La distribución geográfica de los genotipos reveló que el GT1 predominaba en el norte (75.3%), el GT2 en el sureste (37.7%), y el GT3 en el sur (13.8%) (Sedeño-Monge et al., 2021).



**Figura 2. Distribución de genotipos del VHC en México** a) Mapa de calor del número acumulado de nuevos casos de infección por VHC en todo México por entidad federativa. Los diez primeros estados están marcados en rojo, de mayor a menor: Baja California Norte (BCN), Ciudad de México (CMX), Jalisco (JAL), Sinaloa (SIN), Estado de México (MEX), Chihuahua (CHH), Tamaulipas (TAM), Sonora (SON), Veracruz (VER), Puebla (PUE). (Total N = 25,247). b) Mapa con la ubicación geográfica de los principales genotipos del VHC en diferentes regiones de México.

### **2.1.2. Vías de transmisión y personas de riesgo**

La transmisión del VHC ha cambiado con el tiempo, según se va dando la evolución de la medicina, de cambios sociales y de salud. Las principales vías de transmisión del virus son la exposición parenteral, la transmisión parenteral no aparente y la exposición ocupacional.

Antes de 1990, el principal factor de riesgo de infección por VHC era la transfusión sanguínea, ya que no se contaba con el cribado del donante para la prueba de anticuerpos contra ese agente (Ramadori and Meier, 2001). Sin embargo, todas las donaciones se deben analizar mediante pruebas de amplificación de los ácidos nucleicos para detectar directamente el ARN del VHC, ya que los anticuerpos no son detectables en sangre en las primeras semanas o meses de infección reciente (World Health Organization, 2017). La hemodiálisis también es una vía de transmisión de sangre a sangre, sobre todo en poblaciones en desarrollo. Según estudios, el rango oscila entre el 3 y el 62.7% (Fabrizi et al., 2013; Fissell et al., 2004).

Las personas nacidas entre 1946 y 1964 pertenecen a una generación en la que la infección con el VHC era muy común. Esto probablemente debido a la gran proporción de personas que usaba drogas durante la mayor parte de su vida (Saab et al., 2015). Teniendo en cuenta la alta tasa de transmisión del VHC en personas que se inyectan drogas, es importante resaltar que se debe reducir los tratamientos inyectables en poblaciones con mayores riesgos de contraer una infección, para así disminuir la transmisión y a su vez evitar las reinfecciones en las personas que tengan mal manejo y uso de las jeringas.

Existe también la posibilidad de darse una transmisión sexual, aunque es menos frecuente. En un estudio con duración de 10 años, se observó una tasa de incidencia de 0.37 por cada 1,000 personas al año en parejas monógamas (Vandelli et al., 2004). Es más común la transmisión en personas heterosexuales con múltiples parejas comparados con parejas heterosexuales monógamas (De Jesús-Caraballo et al., 2008; Terrault et al., 2013). Sin

embargo, el VHC es recientemente transmitido en hombres homosexuales, particularmente aquellos que ya tienen infección con VIH (Karageorgopoulos et al., 2015).

Por otro lado, se estima que existe un 5.8% de riesgo de que ocurra una transmisión vertical en niños nacidos de madres con anticuerpos y ARN positivos para VHC. Además, contrario a muchas otras infecciones, el riesgo de contagiar a un recién nacido por cesárea está presente ya que un prolongado rompimiento de membranas puede aumentar el riesgo. No existe riesgo por una transmisión a través de la lactancia materna (Benova et al., 2014).

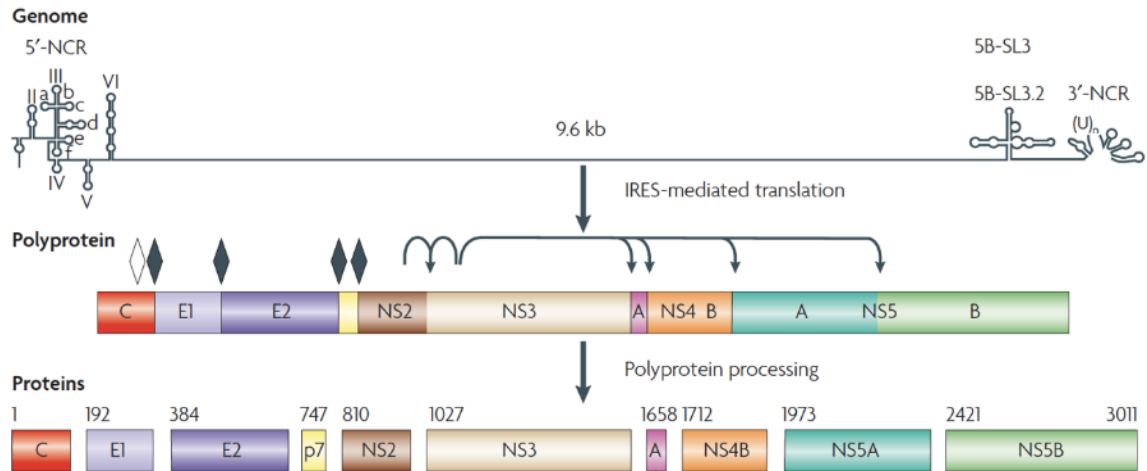
### **2.1.3. Agente etiológico**

Después de ser descubierto el agente etiológico de la hepatitis no A no B y ser reconocido como el VHC, se realizaron estudios para conocer a profundidad al virus y con base en sus características genotípicas y estructurales se decidió clasificarlo como miembro prototipo del género Hepacivirus de la familia *Flaviviridae*.

#### **2.1.3.1. Características genotípicas**

El genoma del VHC consta de aproximadamente 9,600 nucleótidos (Q. L. Choo et al., 1991; Kolykhalov et al., 1996). Teniendo un único marco de lectura abierto (ORF) de ~9,000 nucleótidos de longitud. Posee un extremo 5' como región no traducida (UTR), que incluye un sitio de entrada a ribosoma interno (IRES) y posee otra UTR en su extremo 3', las regiones UTR de los extremos 3' y 5' son críticas para el ciclo de replicación viral. La traducción del ORF produce una poliproteína (pp) de ~3,000 aminoácidos (aa). A su vez, esta pp es escindida por la acción de proteasas virales y del huésped para el producto de tres proteínas estructurales (Core, E1 y E2), para el ensamblaje de nuevas partículas virales, y siete proteínas no estructurales (NS) para permitir el adecuado ciclo de replicación viral (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (**Figura 3**) (Bukh, 2016).



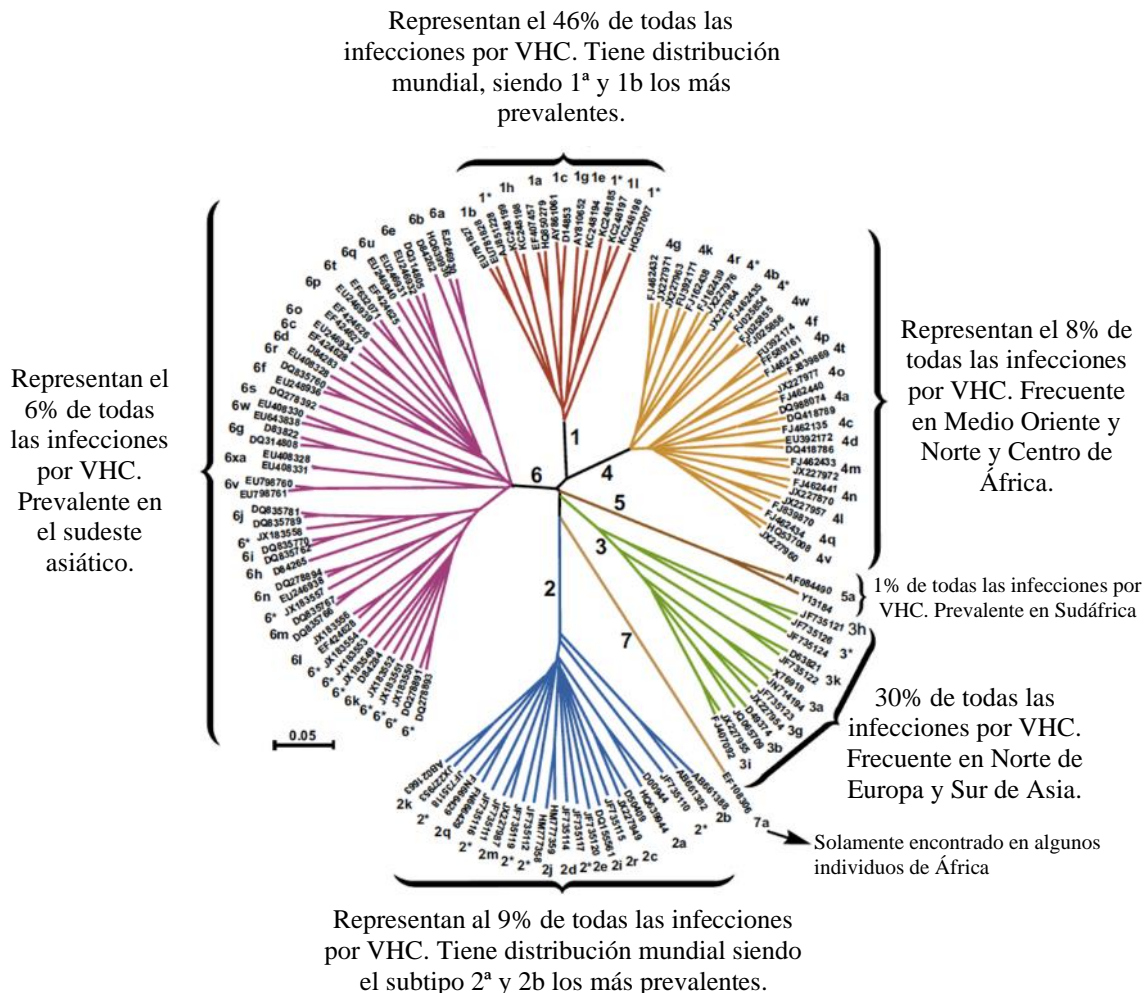


**Figura 3. Organización genética y procesamiento de la poliproteína del VHC.** El genoma de ARN de cadena positiva de 9.6 kb se representa esquemáticamente en la parte superior. Se muestran las estructuras secundarias de ARN simplificadas en las regiones no codificantes (UTR) 5' y 3', así como el elemento de replicación que actúa en cis del tallo-bucle 3 de NS5B (5B-SL3). La traducción mediada por el sitio de entrada del ribosoma interno (IRES) produce un precursor de poliproteína que se procesa en proteínas maduras estructurales y no estructurales. Los números de aminoácidos se muestran encima de cada proteína (cepa HCV H; genotipo 1a; número de acceso de GenBank AF009606). Los rombos de color oscuro indican sitios de escisión del precursor de poliproteína del VHC por la peptidasa del retículo endoplásmico. El rombo blanco indica un procesamiento C-terminal adicional de la proteína central por la peptidasa. Las flechas indican escisiones por las proteasas NS2-3 y NS3-4A del VHC (Moradpour et al., 2012)

En 1993, un análisis filogenético de las secuencias parciales del VHC recuperadas de un gran número de aislamientos de pacientes de todo el mundo demostró que el virus podía clasificarse en 6 genotipos principales (Simmonds et al., 1993). Los genotipos 1 al 6 todavía son de importancia epidemiológica. No obstante, un estudio en 2014 confirmó la existencia de 7 genotipos y 67 subtipos (Smith et al., 2014) (**Figura 4**).

### 2.1.3.1. Proteínas virales

Una vez que la pp es traducida, pasa un proceso de escisión para así dar lugar a las distintas proteínas virales, tanto estructurales como no estructurales. Todas estas con alguna función específica para culminar con el objetivo de cada ciclo de replicación viral.



**Figura 4. Distribución mundial de Genotipos y subtipos del virus de hepatitis C.** El árbol filogenético está basado en la secuencia nucleotídica del ORF. Imagen adaptada (Smith et al., 2014).

La proteína Core, es la primera proteína estructural en ser codificada por el ORF, y es la proteína central que forma la nucleocápside viral. Posiblemente, interacciona con gotitas de lípidos afectando así el metabolismo y contribuyendo al desarrollo de la esteatosis hepática, que es frecuente durante la infección con VHC (Guidi et al., 2006; McLauchlan et al., 2002).

Las proteínas E1 y E2 son glicoproteínas de la envoltura y forman un complejo no covalente del que está formada la envoltura viral. La estructura tridimensional de este complejo de la envoltura es clave para que se dé la unión del receptor y para que se dé la fusión, ya ambos están mediados por estas proteínas (Dubuisson et al., 2002)

El polipéptido p7 consta de 63 aa y no es necesario para la replicación del ARN *in vitro*, pero es esencial para la infección productiva *in vivo*. Se piensa que pudiera pertenecer a la familia de las viroporinas y que tiene un papel importante en la liberación de las nuevas partículas virales (Sakai et al., 2003)

El complejo NS2-3 es una proteasa que se autoescinde y es una de las proteínas que más dificultad ha generado para su estudio. Esta proteasa escinde también a las proteínas NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Es prescindible para la replicación del ARN *in vitro*, pero es esencial para completar el ciclo de replicación tanto *in vitro* como *in vivo*. (Thibeault et al., 2001).

El complejo NS3-4A, esta es una proteasa que también escinde a las proteínas NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. También ha sido blanco para el desarrollo de antivirales (Lamarre et al., 2003). Recientemente, ha demostrado que escinde e inactiva a dos proteínas adaptadoras que participan en la respuesta inmune innata, Trif y Cardif (también llamada MAVS, IP-1 y VISA) (K. Li et al., 2005; Meylan et al., 2005).

Adicionalmente, la NS3 también actúa como helicasa y participa en el desenrollamiento de ARN bicatenario o de ARN monocatenario con estructuras secundarias. No está del todo estudiado porque la NS3 tiene ligadas espacialmente la actividad de proteasa y de ARN helicasa, pero se cree que esta relación es esencial (Frick et al., 2004).

La proteína NS4B no está tan caracterizada como las otras proteínas virales. Una de las funciones que se conocen es que induce a la formación de una red membranosa y que esa

red sirve como andamio para todo el complejo de replicación que se verá más adelante (Egger et al., 2002).

Por otro lado, la proteína NS5A juega un rol importante en la replicación del virus, así como en la regulación de algunas vías de señalización celular. Se cree que NS5A interactúa con balsas lipídicas de membranas intracelulares, lo que al parecer es crucial para la formación del complejo de replicación del VHC (Gao et al., 2004; Shi et al., 2003; Tu et al., 1999). Además, NS5A puede interactuar con la proteína quinasa R (PKR) e inhibir su acción, esto le permite tener un papel en la resistencia al interferón, ya que la PKR participa en la vía de señalización (Gale et al., 1998). Otras vías que se puede ver alteradas por la NS5A, son las relacionadas con el crecimiento celular (Kawaguchi and Mizuta, 2014; Tan and Katze, 2001).

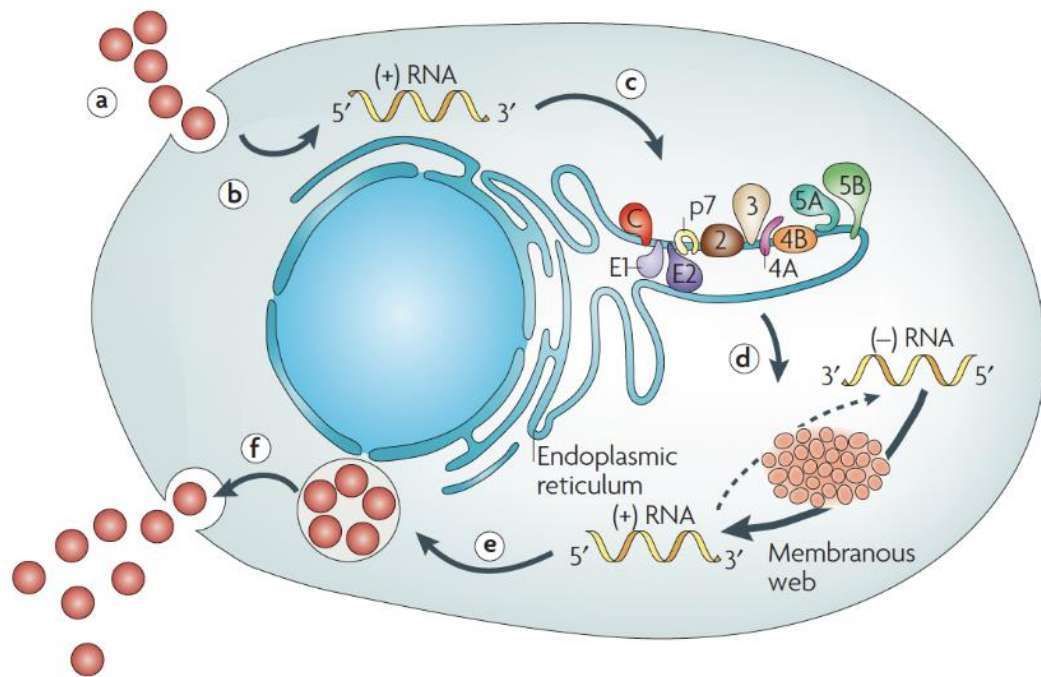
En el extremo C terminal de la poliproteína, se encuentra la NS5B, que representa a la subunidad de RNA polimerasa, dependiente de RNA (RdRp), que conforma al complejo de replicación. NS5B es capaz que realizar una elongación de 150-200 nucleótidos por minuto a 22°C (Lohmann et al., 2000; Oh et al., 1999). Aunque NS5B es capaz de iniciar la síntesis de ARN de una manera dependiente del cebador o mediante un mecanismo de "copia de retorno", en presencia de altas concentraciones de ATP o GTP, recientemente se ha demostrado la iniciación *de novo* de la síntesis de ARN (Kao et al., 2000; Zhong et al., 2000).

### **2.1.3.2. Ciclo de replicación**

Los hepatocitos son las principales células diana, sin embargo, también se ha reportado infección en células B, células dendríticas, monocitos y otros tipos celulares. Los receptores propuestos para el VHC son la CD81, LDLR, el SR-BI y la claudina-1 (Agnello et al., 1999; Cocquerel et al., 2006; Evans et al., 2007; Pileri et al., 1998; Scarselli et al., 2002). Los receptores CD81 y SR-BI se unen con E2 y ambos son necesarios para la

entrada del VHC al interior de la célula para proceder a realizar su ciclo de replicación (Figura 5).

El VHC entra a la célula por endocitosis mediada por clatrina, y es contenido en un endosoma de pH bajo donde se genera la fusión de membranas (Koutsoudakis et al., 2006; Tscherne et al., 2006). La acidificación dentro del endosoma induce la fusión de la membrana de glicoproteínas del VHC. Seguido de esto, se da la liberación del genoma del virus hacia el citoplasma. Los dominios II, III y IV del extremo 5'UTR del genoma, junto con los primeros 24-40 nucleótidos constituyen el IRES. El inicio de la traducción del genoma se produce mediante la formación de un complejo entre el IRES y la subunidad 40S del ribosoma (Moradpour et al., 2012). Una vez traducida la poliproteína, es escindida y se producen a su vez, las proteínas estructurales y no estructurales para cumplir cada una de sus funciones anteriormente mencionadas.



**Figura 5. Ciclo de replicación del VHC.** a. Unión e internalización del VHC a la célula; b. Liberación al citoplasma; c. traducción mediada por IRES y procesamiento de poliproteína; d. Replicación del ARN; e. Ensamblaje de nuevos viriones; f. Maduración y liberación de viriones (Moradpour et al., 2012).

Para la replicación del genoma, se da una asociación entre el complejo de replicación y membranas celulares. La replicación, puede suceder en membranas alteradas derivadas del retículo endoplásmico (RE), del aparato de Golgi, de la mitocondria o incluso de lisosomas (Gosert et al., 2003; Salonen et al., 2004). En este caso, las membranas del RE son ricas en colesterol y ácidos grasos, y su concentración puede llegar a modular la replicación del virus (Kapadia and Chisari, 2005). La proteína NS4B parece ser suficiente para inducir a esta asociación con membranas (Egger et al., 2002; Gretton et al., 2005).

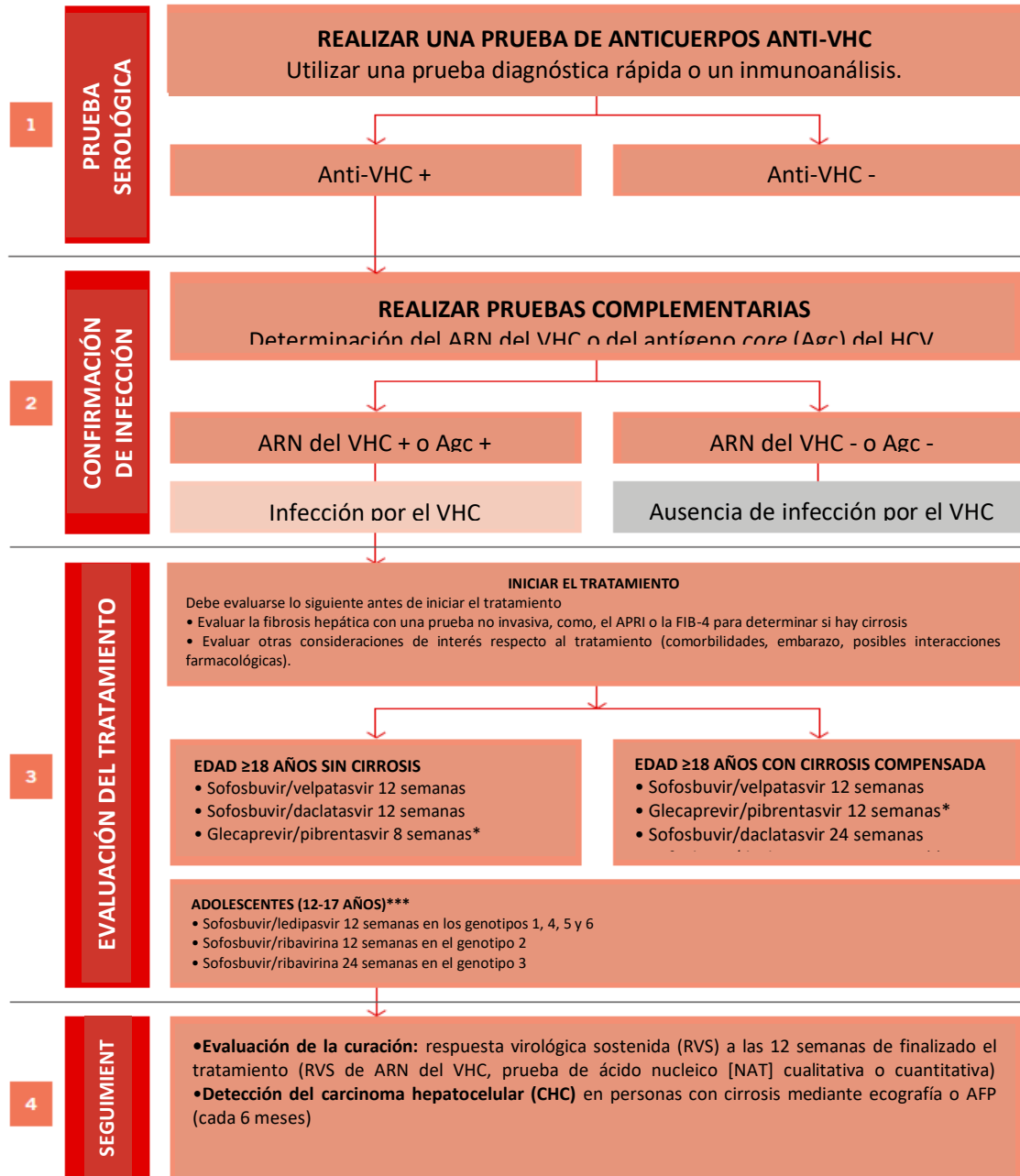
Se ha postulado que la replicación del VHC es semi-conservadora y asimétrica con dos pasos, ambos catalizados por NS5B RdRp. El ARN del genoma de hebra positiva sirve como molde para la síntesis de un genoma intermedio de replicación de hebra negativa durante el primer paso. En el segundo paso, el ARN de cadena negativa sirve como molde para producir numerosas cadenas de polaridad positiva que posteriormente se utilizarán para la traducción de más poliproteínas, síntesis de nuevos intermedios de replicación o empaquetamiento en nuevas partículas de virus (Bartenschlager et al., 2004). Una vez que se tienen genomas y proteínas necesarias se da el ensamblaje de nuevos viriones, algunos estudios sugieren que la proteína Core es suficiente para el ensamblaje de la cápside (Klein et al., 2005; Kunkel et al., 2001; Majeau et al., 2004). En general, la formación de nuevos viriones se inicia por la interacción de la proteína Core con el RNA genómico a través de los dominios I y III del tallo-bucle y los primeros 23-41 nucleótidos (Shimoike et al., 1999; Tanaka et al., 2000). Posteriormente, ya que las glicoproteínas de la envoltura del VHC E1 y E2 se asocian con las membranas del RE a través de sus dominios transmembrana (Cocquerel et al., 1998), se sugiere que el ensamblaje del virus se produce en el RE. Se han detectado proteínas estructurales tanto en el RE como en el aparato de Golgi, por lo que ambos compartimentos están involucrados en etapas de maduración posteriores (Serafino et al., 2003). Finalmente, los viriones salen derivados de los compartimentos salen de la célula a través de la vía secretora (Moradpour et al., 2012).

#### **2.1.4. Cuadro clínico**

La infección aguda por VHC suele ocasionar síntomas solo al 20-30% de los adultos. Los inicios de los síntomas pueden variar de 3 a 12 semanas después de la exposición al patógeno (Alter and Seeff, 2000; Thimme et al., 2001). Los síntomas más comunes pueden incluir malestar, debilidad, anorexia e ictericia. A su vez, los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) comienzan a aumentar de 2 a 8 semanas después de la exposición al virus. Por otro lado, el ARN del VHC se puede detectar en suero entre la primer y segunda semana de exposición (Farci et al., 1991; Thimme et al., 2001). Los niveles de ARN viral aumentan rápidamente durante las primeras semanas hasta alcanzar picos entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>7</sup> UI/mL, poco antes del inicio de los primeros síntomas. En la hepatitis C aguda, los síntomas pueden durar varias semanas y desaparecer a medida que disminuyen los niveles de ALT y RNA viral (Farci et al., 1996). Algunos estudios han revelado que existen resoluciones virológicas espontáneas en el 15-25% de los pacientes con hepatitis C aguda (Afdhal, 2004).

#### **2.1.5. Tratamiento**

Inicialmente, el interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ) y su análogo, el IFN- $\alpha$  pegilado (PEG-IFN- $\alpha$ ) solo o en combinación con ribavirina (RBV) han sido el principal tratamiento antiviral para la infección con VHC durante muchos años (Kakumu et al., 1993). Sin embargo, con los nuevos estudios del VHC se han desarrollado nuevos fármacos llamados antivirales de acción directa (AAD) que han podido ofrecer una tasa de 95% de curación (Dash et al., 2020). La OMS recomienda ofrecer tratamiento a todos los individuos a los que se diagnostique una infección por el VHC y tengan una edad igual o superior a 12 años, con independencia de cuál sea el estadio de la enfermedad, esto bajo el un algoritmo para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la infección crónica por el VHC en adultos y adolescentes (WHO, 2018) (**Figura 6**). La introducción de un tratamiento con AAD orales sumamente eficaces y bien tolerados, que proporcionan una curación de la infección por el VHC con tasas elevadas de respuesta virológica sostenida (RVS) en unas semanas, transformó el panorama terapéutico de las personas con infección crónica por el VHC.



**Figura 6. Algoritmo resumido para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la infección crónica por el VHC en adultos y adolescentes.** \* Las personas con una infección por el VHC del genotipo 3 que han recibido tratamiento con interferón o con ribavirina en el pasado deben ser tratadas durante 16 semanas. \*\* Puede considerarse la posible conveniencia de su uso en los países en los que se conoce la distribución de los genotipos y la prevalencia del genotipo 3 es <5%. \*\*\* En este momento, el tratamiento de los adolescentes requiere todavía la determinación del genotipo para identificar la pauta de tratamiento apropiada. AFP: alfafetoproteína, APRI: índice de cociente de aspartato/plaquetas; FIB-4: estadio de la fibrosis. (WHO, 2018).

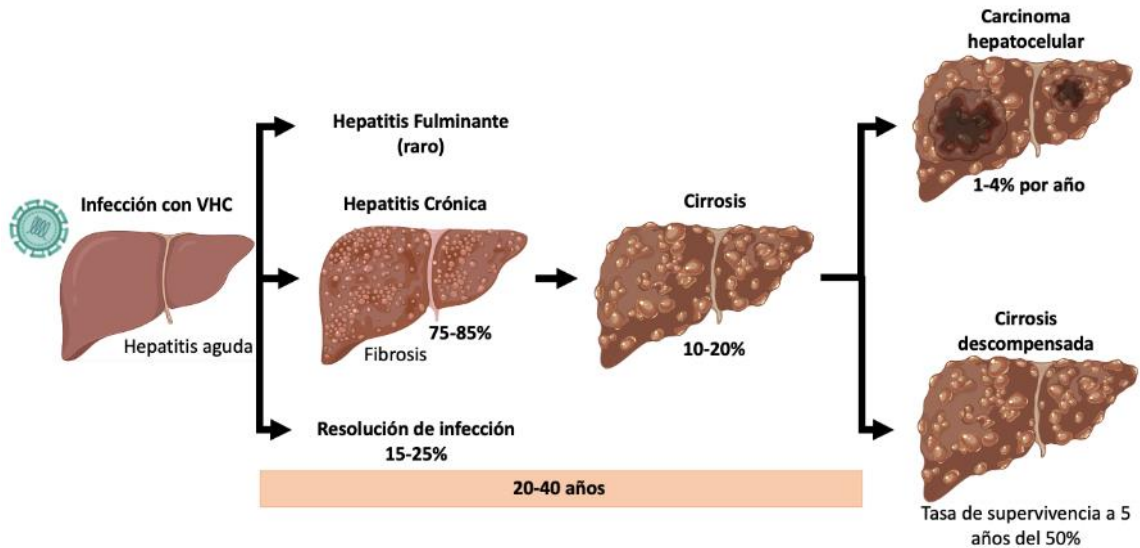


Algunos estudios apoyan que la resolución de la infección de VHC con AAD beneficia a los pacientes, ya que la inflamación hepática disminuye, la fibrosis se revierte y la incidencia de trasplantes de hígado y complicaciones extra hepáticas relacionadas con el hígado disminuye (Dang et al., 2019; Flemming et al., 2017; Lledó et al., 2018; Nahon P, Bourcier V, 2017). Sin embargo, varias publicaciones recientes de EUA, Europa y Asia indican que los pacientes que tienen cirrosis hepática en el momento del tratamiento con AAD se enfrentan al riesgo de aparición y recurrencia de CHC después de la resolución viral (Ioannou et al., 2019; Nahon et al., 2018; Nakano et al., 2019; Piñero et al., 2019).

### **2.1.6. Complicaciones**

Alrededor de un 75-85% de las personas infectadas con el VHC no logran eliminar la infección de forma natural, lo que lleva a una etapa de infección crónica de por vida. La inflamación prolongada del hígado debido a la infección provoca la aparición de enfermedades como fibrosis hepática, cirrosis compensada, cirrosis descompensada y finalmente un CHC que comúnmente provoca la muerte. El desarrollo de estas enfermedades se da entre las dos y cuatro décadas de la infección. De los pacientes que presentan una hepatitis C crónica, el 20-30% desarrolla cirrosis hepática y el 1-4% de estos desarrollan CHC (Gower et al., 2014). Y aunque es más común que el CHC sea provocado después de la cirrosis, hasta el 15% de pacientes que desarrollan CHC pueden no tener cirrosis, lo que apoya una hipótesis de que la infección por el VHC también puede inducir el CHC directamente (Desai et al., 2019; Paradis et al., 2009) (**Figura 7**).

Existen algunos factores de riesgo para que se presente una infección crónica por VHC, incluidos la edad en el momento de la infección, el género, la etnia, el desarrollo de ictericia durante la infección aguda y el estado del sistema inmunológico de cada paciente.



**Figura 7. Progresión de las complicaciones causadas por la infección con VHC.**

La infección en personas menores de 25 años es menos propensa a desarrollar una hepatitis C crónica. Además, se han identificado más casos de cronicidad en hombres que en mujeres. Adicionalmente y por razones aún sin identificar, se cree que las personas de origen afroamericano tienen una mayor tasa de cronicidad comparado con personas caucásicas y blancas hispanas. Por otro lado, el riesgo de tener una infección crónica también es mayor en aquellas personas que presentan ictericia durante la infección aguda. Asimismo, personas con enfermedades que pudieran suprimir su sistema inmunológico también presentan mayor riesgo a desarrollar una hepatitis C crónica (Afdhal, 2004).

### **2.1.7. Patogénesis**

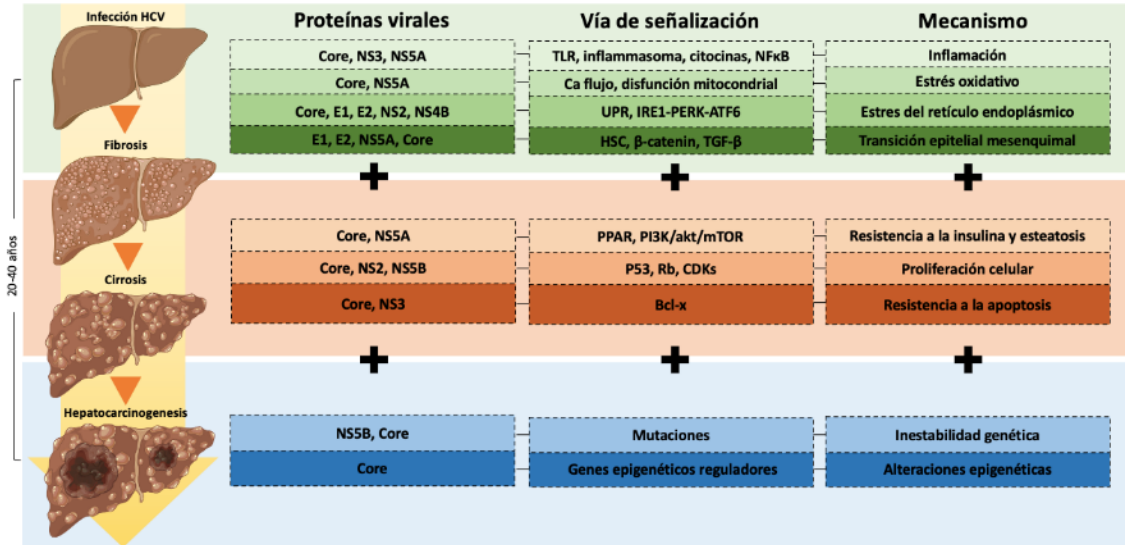
La infección por VHC induce a daño hepático por la inflamación y otros procesos inmunomediados. Durante la etapa inicial del daño, las alteraciones funcionales y morfológicas en el hígado aún son reversibles si se eliminan los agentes o factores causantes del daño. Durante la infección persistente, la inflamación crónica da como resultado un daño hepático prolongado sin eliminación del virus (Arzumanyan et al.,

2013). Por otro lado, el daño inmunomediado provoca regeneración hepatocelular continua lo que da lugar a una fibrosis progresiva. Si la persistencia de la lesión continúa de manera crónica puede causar daño irreversible y el hígado sufre cambios de adaptación fisiológica hacia una adaptación patológica. El resultado de esta adaptación es la cirrosis, ya que el estrés celular provoca cambios tanto estructurales como funcionales del hígado para tratar de escapar de la lesión. El recambio y generación progresiva de células que se sigue dando como resultado de inflamación y procesos inmunomediados, puede promover el desarrollo del CHC como otra adaptación patológica ante el estrés celular (Mitchell et al., 2015).

#### **2.1.8. Mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis inducida por el VHC.**

Dado que los pacientes con hepatitis C pueden desarrollar CHC después de 30-40 años, que los hepatocitos no infectados también pueden convertirse en células tumorales y que la integración del genoma viral en el huésped está ausente, se considera que el VHC no es directamente oncogénico, sino que juega un papel indirecto en el desarrollo de la carcinogénesis. Sin embargo, existe una relación directa entre la infección crónica por VHC y el desarrollo de CHC. Esto sugiere que el virus también desempeña un papel directo en la promoción del desarrollo de la carcinogénesis, pero esto se logra a través de la acción de sus proteínas virales y la generación de un microambiente tumorigénico en las células infectadas.

Algunos mecanismos de la progresión de la hepatocarcinogénesis asociada a la infección por VHC son la inflamación crónica, el estrés oxidativo, la resistencia a la insulina, la esteatosis, las alteraciones epigenéticas y la inestabilidad genética, la transición epitelial-mesenquimal, la proliferación, la apoptosis y la activación de células estelares hepáticas (CEH) entre otros. Sin embargo, cada mecanismo tiene una o varias vías moleculares específica regulada por las proteínas virales del VHC (Irshad et al., 2017) (**Figura 8**).

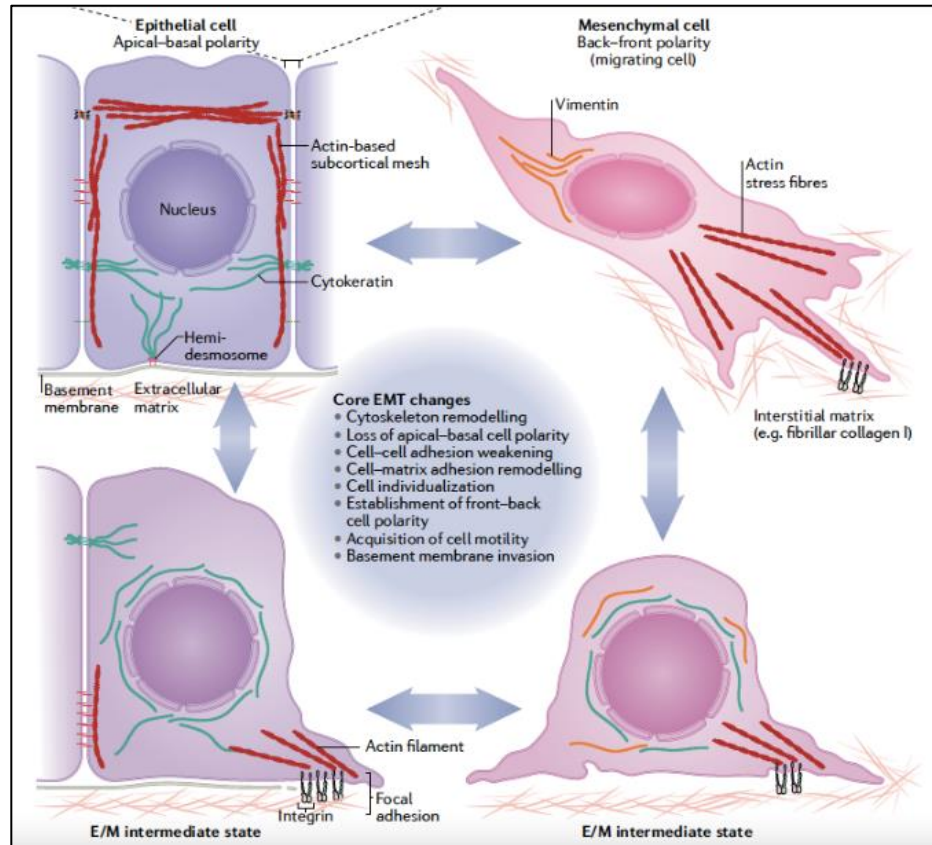


**Figura 8. Mecanismos moleculares implicados en la progresión de la hepatocarcinogénesis inducida por la infección por VHC.** Mecanismos moleculares implicados en la progresión de la hepatocarcinogénesis inducida por la infección por VHC. La progresión de la hepatocarcinogénesis asociada a la infección por el VHC implica diversos mecanismos moleculares, como inflamación crónica, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, transición epitelial-mesenquimatoso, esteatosis y resistencia a la insulina, inhibición de la proliferación y la apoptosis, inestabilidad genética y alteraciones epigenéticas. Cada mecanismo tiene una vía molecular específica regulada por proteínas virales del VHC.

### 2.1.8.1. Transición epitelial mesenquimal

Normalmente las células epiteliales maduras exhiben plasticidad en condiciones ambientales específicas. Cuando estas células interactúan con las mesénquimas circundantes, pierden algunas de sus características, incluidas las conexiones intercelulares y la polaridad. También pueden adquirir nuevas propiedades, como la capacidad de infiltración y migración. El fenómeno descrito se denomina transición epitelial-mesenquimal (TEM) (**Figura 9**), mientras que el proceso inverso se denomina Transición mesenquimal-epitelial (TME) (Greenburg and Hay, 1982; Zeisberg and Neilson, 2009).

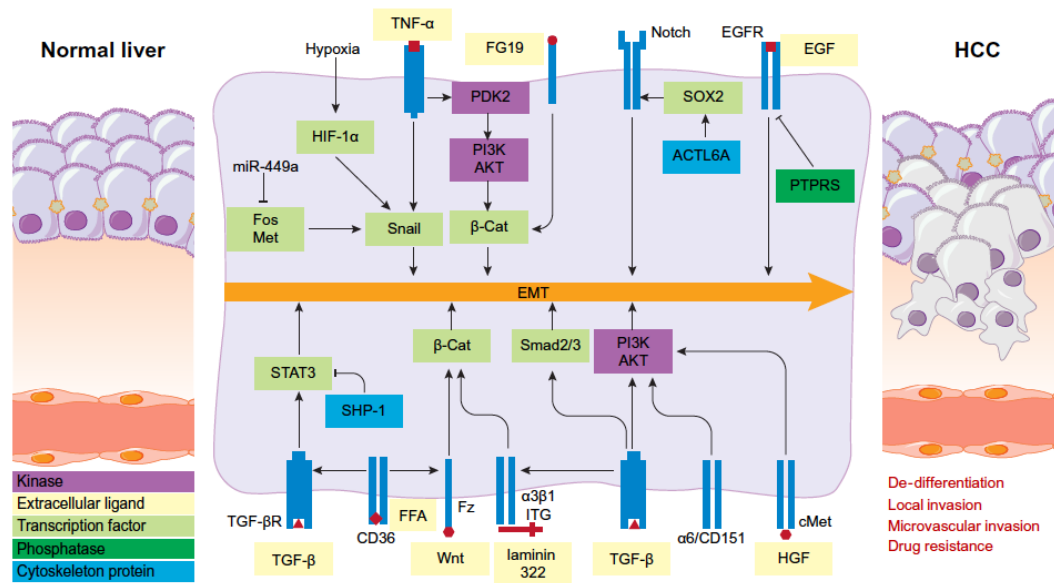
La TEM se puede dividir en tres tipos según las diferentes condiciones corporales. La TEM de tipo I que se relaciona principalmente con el desarrollo de embriones biológicos celulares. Por otro lado, la TEM tipo II se asocia con fibrosis de órganos, reparación de daños y regeneración de tejidos. Por último, la TEM de tipo III está estrechamente relacionada con la invasión tumoral y la metástasis (López-Nouoa and Nieto, 2009; Pinzani, 2011). En particular, la fibrosis hepática se asocia principalmente con la TEM de tipo II. Se ha demostrado que los hepatocitos son capaces de convertirse en células mesenquimales. La TEM de hepatocitos se puede caracterizar por una disminución en la expresión de marcadores epiteliales como la E-Cadherina y por un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales como la vimentina y colágeno I. La TEM de hepatocitos se puede inducir por el tratamiento con la citocina pro-fibrogénica conocida como factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) (Kaimori et al., 2007). Cabe destacar que la infección con VHC en el cultivo de células induce al estrés del retículo endoplásmico y activa la respuesta a proteínas mal plegadas, lo que a su vez desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y se activan vías de señalización de la MAPK las cuales finalmente pueden dar lugar a la producción de TGF- $\beta$  (Chusri et al., 2016; Lin et al., 2010). Una vez que los hepatocitos pasan de ser células epiteliales a miofibroblastos, estos son capaces de originar la producción de componentes de la matriz extra celular (MEC) (S. J. Lee et al., 2014), la cual es un componente estructural insoluble complejo ubicado fuera de las células. En un hígado sano, representa aproximadamente el 10% del volumen total ya que está en constante producción y degradación. Sus principales componentes son las glucoproteínas de colágeno y no colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, glucosaminoglicanos, enzimas y citocinas que están relacionadas con el metabolismo de la matriz (Bruckner-Tuderman and Bruckner, 1998). Sin embargo, en un hígado con lesión crónica, la regeneración excesiva del hígado conduce a un depósito desproporcionado de MEC lo que finalmente induce fibrosis hepática.



**Figura 9. Principales cambios celulares durante la transición epitelial mesenquimal.** Durante la transición epitelial mesenquimal se generan diversos cambios morfológicos en las células epiteliales, tales como una reconfiguración del citoesqueleto, pérdida de polaridad apico-basal, se van perdiendo proteínas de adhesión intercelulares, aumenta la adhesión con la matriz extracelular a través de integrinas, generación de filopodios y ganancia de motilidad, lo cual es característico de una célula de fenotipo mesenquimal (J. Yang et al., 2020).

Asimismo, la TEM también puede inducir a los procesos de carcinogénesis mediante diversas vías de señalización implicadas (**Figura 10**), una de ellas incluye a una serie de factores dentro de la familia SNAI con miembros como Snail (SNAI1) y slug (SNAI2); familia Twist con factores como Twist 1 y 2, E12, E47 e ID; y la familia ZEB que incluye ZEB 1 y 2. La acción de estos factores induce a la reducción de E-Cadherina indicativo de la TEM. De los factores de estas familias, Snail es el mayor inductor de la TEM durante el desarrollo del CHC (Lamouille et al., 2014; Van Roy, 2014). Un estudio realizado en pacientes con CHC mostró que el 56% presentaba sobreexpresión de Snail, Slug y Twist y se correlacionó con la baja expresión de E-Cadherina y ambos casos se relacionaron con

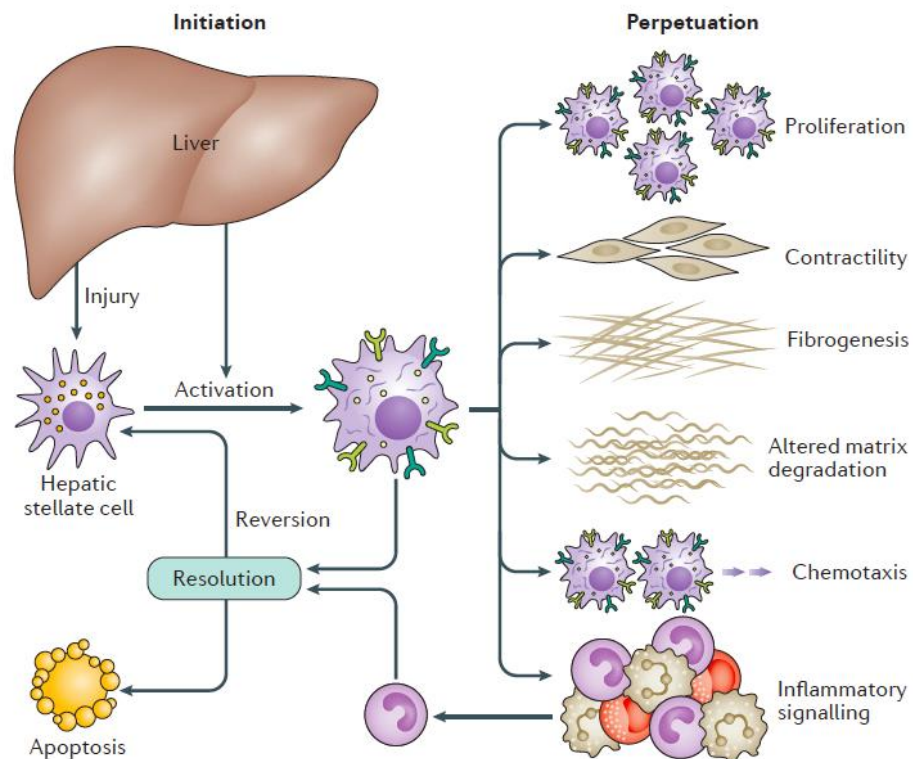
la agresividad de la enfermedad (M. H. Yang et al., 2009). Por otro lado, algunas integrinas como la  $\alpha 6 \beta 1$  se han correlacionado con un peor pronóstico clínico, mala supervivencia y recurrencia temprana del cáncer (Ke et al., 2011). Las integrinas juegan un papel clave en la progresión del CHC, interactuando con las diferentes proteínas de la MEC. Estas moléculas, presentes en el microambiente, son responsables de la diseminación y el crecimiento de las células cancerosas, un ejemplo de éstas es la laminina-332, que se expresa en el caso de neoplasias malignas como el CHC y el colangiocarcinoma (Guess and Quaranta, 2009). La presencia de laminina-332 junto con el TGF- $\beta$ , discutido previamente como un inductor de la TEM, es importante para completar el proceso de transformación de múltiples etapas de la TEM de las células del CHC constitucionalmente no invasivas (G. Giannelli et al., 2006). La laminina-332 es producida por las CEH y estimula la proliferación de células de CHC a través de interacciones con los receptores de integrina  $\alpha 3 \beta 1$  y  $\alpha 6 \beta 4$  (Bergamini and Sgarra, 2008; Santamato et al., 2011). Sin embargo, cabe destacar que existen diversas vías de señalización implicadas en la progresión del CHC derivado de la TEM que aún no han sido del todo relacionadas con el VHC (**Figura 10**).



**Figura 10. Vías moleculares que desencadenan la TEM durante el desarrollo y la progresión del CHC.** Imagen de (Gianluigi Giannelli et al., 2016)

### 2.1.8.2. Activación de células estelares hepáticas (CEH)

Por otro lado, en el hígado, se encuentran células que sobresalen y se extienden rodeadas por células endoteliales sinusoidales, es decir, células estelares hepáticas (CEH). Las CEH, identificadas por primera vez por von Kupffer en 1876, se encuentran en el espacio subendotelial de Disse, entre las células endoteliales sinusoidales del hígado y los hepatocitos, representando aproximadamente el 10% de todas las células del hígado. La característica más distintiva de este tipo celular es el almacenamiento de ésteres de retinilo en gotas lipídicas citoplasmáticas. En el hígado normal, las CEH mantienen un fenotipo no proliferativo y quiescente. Sin embargo, tras una lesión hepática como la infección por VHC, las CEH se activan, transdiferenciándose de células que almacenan vitamina A a miofibroblastos, los cuales son proliferativos, contráctiles, inflamatorios y quimiotácticos, caracterizándose por una mayor producción de matriz extracelular (MEC) (**Figura 11**) (Dewidar et al., 2019; Tsuchida and Friedman, 2017).



**Figura 11. Funciones, características y fenotipos de las CEH en la fase de iniciación y perpetuación durante la activación de células estelares hepáticas.** (Tsuchida and Friedman, 2017)



Se ha demostrado que las CEH activadas son la principal fuente de MEC en lesiones hepáticas parenquimatosas y colestáticas experimentales. Se destacan diversos pasos en la activación de estas CEH, entre las que algunas señales moleculares y celulares emergentes son las que impulsan esta importante respuesta celular a la lesión hepática. La iniciación se refiere a los eventos tempranos que hacen que las células respondan a muchas señales extracelulares. La inducción rápida de receptores de factores de crecimiento, el desarrollo de un fenotipo contráctil y fibrogénico y la modulación de la señalización de factores de crecimiento son las características principales de la iniciación. La perpetuación se caracteriza por eventos que amplifican el fenotipo activado. Las CEH que están preparadas por estímulos iniciales pueden responder a una serie de citocinas y factores de crecimiento, principalmente de los macrófagos, lo que resulta en la formación de cicatrices mediante la proliferación, la contractilidad, la fibrogénesis, la degradación de la matriz y la señalización proinflamatoria.

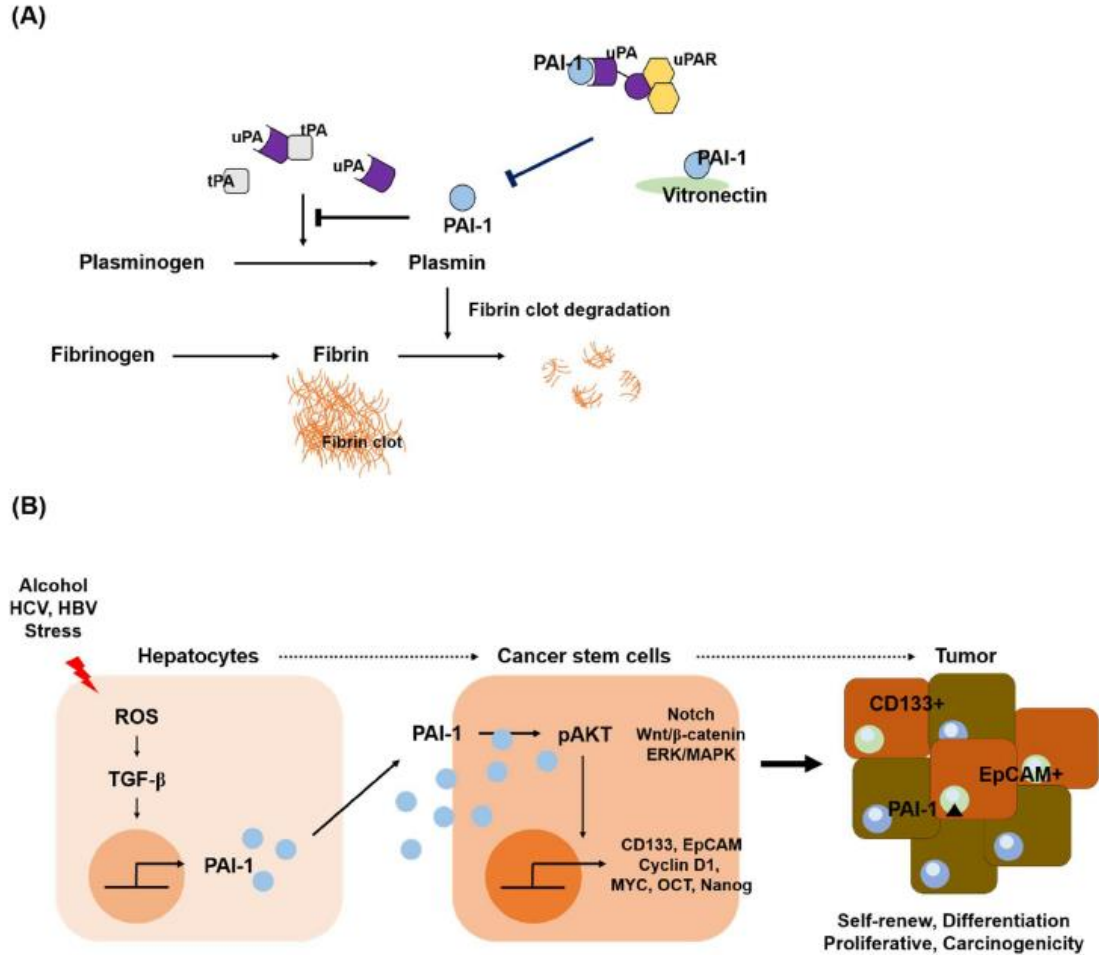
Una apreciación más matizada de estas etapas ahora incluye estados variables de perpetuación de las CEH que distinguen entre un fenotipo fibrogénico temprano y uno inflamatorio senescente posterior. Además, se han aclarado las vías de eliminación de las CEH, que incluyen tanto la muerte celular programada, así como la reversión a un estado más quiescente e inactivo. Se han propuesto diversos factores que pueden llegar a activar a las CEH, el TGF- $\beta$  es una molécula que desempeña un papel crucial en la regulación de la fibrosis hepática. Se libera en el hígado en una forma inactiva y, cuando se activa, desencadena una cascada de eventos que resultan en la activación de las CEH. Cuando el TGF $\beta$  se une a su receptor en la superficie celular, se desencadenan una serie de eventos de señalización intracelular. Esto incluye la fosforilación de proteínas SMAD, en particular SMAD3. La activación de SMAD3 en las CEH activadas conduce la transcripción (producción) de colágeno tipo I y III, algunas metaloproteinasas como MMP2 e inhibidores de MMPs como los TIMPs que son proteínas fundamentales en la regulación de la formación de tejido cicatricial (Breitkopf et al., 2006; Hellerbrand et al., 1999)

### **2.1.8.3. Inhibidor 1 del activador del plasminógeno en la enfermedad hepática**

La vía del plasminógeno regula la homeostasis de las estructuras de la MEC a través de la fibrinólisis. El plasminógeno se convierte en plasmina mediante activadores del plasminógeno (PAs): el activador del plasminógeno tipo tejido (tPA) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en diversos tejidos, lo que conduce a la proteólisis. El inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) es un regulador importante de la vía del plasminógeno y participa en la regulación de la actividad tPA/uPA. PAI-1 es miembro de la familia de genes inhibidores de serina proteasa y se produce principalmente en el endotelio, expresándose en diversos tipos celulares como adipocitos, macrófagos, miocardiocitos y fibroblastos. La expresión génica de PAI-1 se ve afectada por numerosos factores de transcripción y tipos celulares, y está estrechamente regulada por citocinas y factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la insulina (Nam, Angelucci, et al., 2021).

En condiciones normales, PAI-1 desempeña una función en el proceso de reparación de heridas al inhibir la actividad de las metaloproteinasas dependientes de uPA/tPA/plasmina, facilitando la deposición de proteínas de la MEC. La regulación de esta actividad puede ocurrir mediante la formación del complejo PAI-1/uPA o mediante la interacción con la vitronectina (**Figura 12**) (Nam, Seong, et al., 2021).

PAI-1 no solo participa en el proceso de fibrinólisis, sino que también tiene un impacto en la señalización celular para la transición y migración de las células en el tejido hepático. El TGF- $\beta$  induce la expresión de PAI-1, además de aumentar la síntesis de colágeno y proteínas de la MEC al activar las células estelares hepáticas (CEH), que son células clave en el desarrollo de la fibrosis hepática.



**Figura 12. Regulación de la activación de PAI-1 y su papel en los hepatocitos.** (A) Vía del plasminógeno y regulación de PAI-1 en condiciones normales. (B) Lesión hepática causada por alcohol, VHC, estrés y una dieta alta en grasas, estimula la síntesis de TGF- $\beta$ , lo que lleva a la expresión de PAI-1 en los hepatocitos. El aumento en el nivel de PAI-1 induce la activación de AKT y promueve la diferenciación en células madre cancerosas (CSC) con características como la auto-renovación, la proliferación y la supervivencia celulares. La diferenciación en CSC se acompaña de un aumento en la expresión de numerosos oncogenes como ciclina D1, MYC, OCT y nanog, y juega un papel clave en la progresión del carcinoma hepatocelular (CHC) (Nam, Seong, et al., 2021).

En algunos reportes se ha sugerido la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva entre PAI-1 y TGF- $\beta$ , debido a resultados vistos en experimentos donde la síntesis de TGF- $\beta$  es estimulada por PAI-1 (administrado de manera exógena). Este hallazgo podría tener implicaciones importantes en la comprensión de los mecanismos subyacentes

a la fibrogénesis y abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas en enfermedades hepáticas fibrosas (Seo et al., 2009).

#### **2.1.8.4. Participación del VHC en la Inducción de la TEM, activación de CEH y regulación de PAI-1.**

Se ha demostrado que la expresión de NS5A en precursores hepáticos primarios y en líneas celulares de hepatocitos inmortalizados da lugar a modificaciones profundas de la polaridad celular, lo que conduce a la TEM. Además, NS5A coopera con Ras oncogénico, dando lugar a células invasoras transformadas que son altamente tumorigénicas *in vivo* (Akkari et al., 2012). Por otro lado, mutaciones en la proteína Core han demostrado ser capaces de regular la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina, por lo que esta proteína pueda estar implicada en la activación de esta vía y así inducir a la TEM (Aicher et al., 2018). En otro estudio, se demostró que la proteína Core del VHC interactúa con Snail y mejora su unión a la caja E en la región promotora de E-cadherina, lo que conduce a una disminución de la actividad promotora de E-cadherina. Esta regulación fue causada por que la proteína Core, Snail y las histonas desacetilasas HDAC1/HDAC2 forman un complejo co-represor en el promotor de E-cadherina. Además, se ha demostrado que Core estabiliza a Snail mediante la activación de la vía PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  (Nie et al., 2016).

Adicionalmente, se ha demostrado que la proteína Core también es capaz de activar a las CEH (Shahin et al., 2020), que ayudan a promover el desarrollo del CHC. Asimismo, la proteína Core puede inducir a la expresión de actina de músculo liso alfa (SMA- $\alpha$ ) en las CEH mediante la expresión de IL-8 en hepatocitos (Clément et al., 2010) así como otros factores fibrogénicos como pro-colágeno tipo 1, MMP2 y 13, TIMPS 1 y 2, entre otros (Coenen et al., 2011). Algunos estudios, sugieren que factores secretados por células infectadas con el VHC son los activadores, por ejemplo, el perfil de proteínas secretadas por células replicantes del VHC reveló la presencia de UCHL1, así mismo, la UCHL1 se encontró en el hígado y en la sangre de pacientes con hepatitis C crónica. Experimentos adicionales indicaron que la UCHL1 secretada se une a las CEH activando la señalización

JNK y promoviendo la sobreexpresión de  $\alpha$ -SMA, lo que contribuye a la activación de las CEH (Ríos-Ocampo et al., n.d.). Estos hallazgos proporcionan una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes en la fibrogénesis hepática inducida por el VHC.

Por otro lado, se ha observado un aumento significativo en la expresión de PAI-1 en pacientes con hepatitis C crónica y que presentaban CHC o cirrosis (Benkheil et al., 2018). La terapia con AAD resultó en una disminución significativa de los niveles séricos de PAI-1 en pacientes con enfermedad hepática crónica relacionada con VHC en comparación con pacientes sin tratamiento. Adicionalmente, es importante destacar que un estudio reciente identificó que el aumento de PAI-1 inducido por la infección de VHC activa AKT, lo que puede promover la diferenciación en células madre cancerosas a partir de hepatocitos (Nam, Angelucci, et al., 2021).

A pesar de que las proteínas virales del VHC han sido relacionadas con la TEM y activación de CEH y que esto podría involucrar la regulación de PAI-1 existen muchas alternativas en la regulación de las vías de señalización implicadas en ambos procesos que aún no han sido exploradas. El microambiente generado por la infección del VHC y su consecuente activación de la TEM y CEH promueven en gran medida el desarrollo y progresión del CHC y es necesario el estudio de la regulación de estas vías de señalización dentro de este microambiente en un mismo sistema *in vitro* que nos ayude evaluar un panorama más completo acerca de las interacciones celulares que pudieran generar nuevos conocimientos en el progreso de la infección hacia procesos fibrogénicos y tumorigénicos característicos de la enfermedad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La hepatitis C es una enfermedad del hígado causada por el VHC que afecta aproximadamente a 50 millones de personas y ha ocasionado alrededor de 240,000 muertes alrededor del mundo. A pesar de la existencia de tratamientos efectivos contra el virus, las complicaciones generadas por la infección crónica conllevan a la generación de un microambiente alterado que promueve diversos procesos celulares como la transición epitelial mesenquimal de hepatocitos y la activación de CEH. Esto promueve desde el desarrollo inicial de una fibrosis hasta la generación y metástasis de un carcinoma hepatocelular. La proteína NS5A y la proteína estructural Core del virus han sido relacionadas con algunas de las vías de señalización que promueven dichos procesos celulares. Sin embargo, existen diversas alternativas en la regulación de las vías de señalización implicadas que aún no han sido exploradas. Además, es necesario considerar cómo la comunicación intercelular entre CEH y hepatocitos durante la expresión de proteínas virales podría regular los mecanismos moleculares asociados con el desarrollo de fibrosis para tener una mejor aproximación de la patogénesis molecular en la infección por VHC. Esto puede generar conocimiento científico que nos facilite encontrar puntos de control como potenciales dianas terapéuticas. Por lo tanto, nuevos conocimientos en el entendimiento del progreso de la infección hacia procesos fibrogénicos y tumorigénicos característicos de la enfermedad, pueden ser de gran utilidad para un mejor tratamiento y prevención de las complicaciones generadas por la infección con el virus de hepatitis C.

#### **4. HIPÓTESIS**

La expresión de la proteína NS5A y Core del VHC inducen a la transición epitelial mesenquimal de hepatocitos y a la activación de células estelares para promover la expresión de factores involucrados en el desarrollo de la fibrosis y carcinogénesis.

## 5. OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Estudiar los mecanismos moleculares de fibrosis involucrados en la transición epitelial mesenquimal y activación de células estelares hepáticas (LX2) inducidos por la proteína NS5A y Core del VHC.

### **Objetivos específicos**

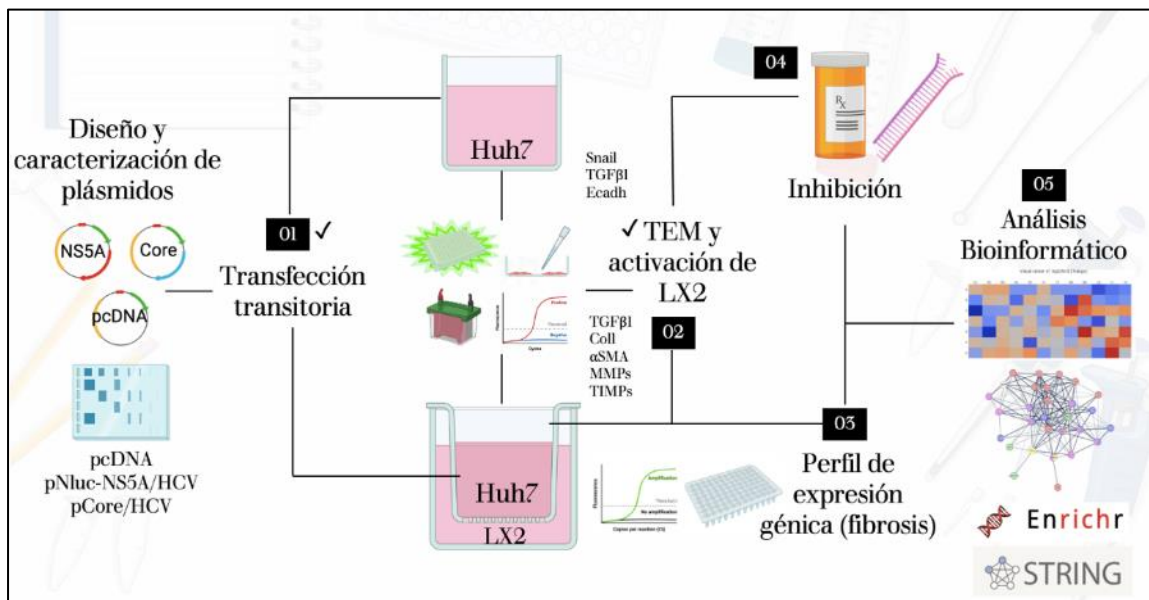
1. Establecer un sistema de expresión transitoria de las proteínas NS5A y Core del VHC.
2. Evaluar la expresión de marcadores de la TEM en Huh7 y de activación de LX2 inducidos por las proteínas NS5A y Core del VHC.
3. Evaluar la expresión transcripcional de genes reguladores de fibrosis durante la TEM de Huh7 y activación de LX2 inducidas por las proteínas NS5A y Core del VHC.
4. Determinar mediante inhibición, la participación de genes reguladores de fibrosis diferencialmente expresados durante la TEM de Huh7 inducida por las proteínas NS5A y Core del VHC.
5. Identificar mediante análisis bioinformáticos, la participación de los genes diferencialmente expresados durante la TEM de Huh7 y la activación de LX2 inducidos por las proteínas NS5A y Core del VHC.



## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental general consistió en las siguientes actividades: diseño y caracterización de plásmidos para la expresión de las proteínas NS5A y Core del VHC, subcultivos celular de las líneas Huh7 y LX2, transfección transitoria de los plásmidos en la línea celular Huh7, co-cultivo celular de las líneas Huh7 con la línea celular LX-2, extracción de ARN y proteínas, actividad de nano luciferasa por quimioluminiscencia, RT-qPCR, western blot, arreglo de RT-qPCR específico para vías de fibrosis, inhibición farmacológica de PAI-1 en células Huh7 y finalmente, análisis bioinformático. El flujoograma de experimentos realizados se muestra en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Estrategia experimental general del proyecto.

### 6.2. Diseño, producción y caracterización de plásmidos

Para los ensayos de transfección se utilizaron tres tipos de plásmidos. Un plásmido control pcDNA 3.1 (+) (GenScript, E.U.A). Un plásmido para la expresión de la proteína

Core del VHC, diseñado a partir del pcDNA 3.1 (+) con la secuencia de la proteína Core del VHC (GenBank: AJ238799.1) (ID del proyecto: U6951CJ230-2). Asimismo, se diseñó el plásmido pNluc-NS5A/HCV para la expresión de la proteína NS5A del VHC, este plásmido fue construido en un vector de expresión génica de mamíferos, incluyendo secuencia de la nano luciferasa (Nluc) como reportero quimioluminiscente (GenBank: OK425853.1) y la secuencia de la NS5A del HCV (GenBank: DQ859971.1), el diseño fue realizado con *VectorBuilder* bajo el siguiente número de ID: VB200914-1750qfm. Una vez teniendo los plásmidos contenidos en las bacterias *E-coli DH5α* éstas fueron crecidas en caldo LB con 100µg/mL de ampicilina. Para la extracción de los plásmidos se llevó a cabo el protocolo de lisis alcalina (Anexos). Una vez obtenidos los plásmidos purificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 1 µg de cada uno de los plásmidos para confirmar su peso e integridad. Para caracterizar los plásmidos, se realizaron cortes con enzimas de restricción tal como indica la **Tabla 1**. Una vez hechas las mezclas, se dejaron incubando a 37°C durante 16 horas, seguido de esto se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para visualizar las bandas generadas por los cortes de las enzimas de restricción y poder confirmar la composición de cada uno de los plásmidos a utilizar durante los ensayos de transfección.

**Tabla 1 Condiciones para la caracterización de plásmidos mediante cortes con enzimas de restricción.**

Plásmido	pcDNA 3µg	pCore/HCV 3µg	pNluc-NS5A/HCV 3µg
Enzima	<i>ApaLI</i> 1 µL	<i>HindIII</i> <i>EcoRI</i> 1 µL c/u	<i>ApaLI</i> 1 µL
Buffer	2 µL	2 µL	2 µL
Agua DEPC	Aforar a 20 µL	Aforar a 20 µL	Aforar a 20 µL

### 6.3. Subcultivos celulares

En general se trabajó con dos tipos de líneas celulares, la línea Huh-7 derivadas de hepatoma humano (donada por el Dr. Koromilas, Universidad McGill, Montreal, Canadá) fue cultivada en ADMEM (Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 2% de suero fetal de bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomycin y 1% de aminoácidos no esenciales (Todos los reactivos provenientes de Gibco, E.U.A). Por otro lado, las células estelares hepáticas humanas LX-2 (donadas por la Dra. María Luz Martínez Chantar, del laboratorio de metabolómica, CIC bioGUNE, España) fueron mantenidas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 2% de SFB y 100U/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomycin. Ambas líneas celulares fueron mantenidas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para garantizar las condiciones óptimas de crecimiento. Para realizar los subcultivos en ambas líneas celulares se siguió protocolo descrito detalladamente en Anexos.

### 6.4. Actividad biológica de *Vaccinia Virus* en células Huh-7.

Ya que la expresión del pCore/HCV es regulada por el promotor T7 es necesaria la infección de células Huh-7 con *Vaccinia virus* (ATCC: VR-2153, cepa vTF7-3 [Wr]) que codifica para la polimerasa de ARN T7. Antes de poder realizar la transfección con el plásmido pCore/HCV es necesario establecer la cantidad óptima de virus para poder lograr la expresión de la proteína viral Core sin causar daño significativo en las células Huh-7. Para evaluar la actividad biológica del virus se realizó de la siguiente manera:

1. Se siembran 200,000 por pozo en placas de 6 pozos.
2. Después de 16 horas de cultivo, se retira el medio de cultivo y se adiciona 1 mL de medio ADMEM de infección (Adicionado con 1% de Glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales).
3. Se realiza una dilución 1:10,000 del Stock de *Vaccinia Virus* en medio de infección y se usan 2 y 5 µL de esta dilución para infectar cada pozo a evaluar.
4. La placa se incuba durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> realizando movimientos suaves de la placa para homogenizar cada 10 minutos.

- Al pasar la hora de incubación se adiciona 1 mL de ADMEM de infección.
- La infección se mantiene por el tiempo necesario para ensayos posteriores y se evalúa el efecto citopático en las células.

### 6.5. Transfección transitoria de los plásmidos en células Huh-7

Para generar el sistema de expresión de las proteínas virales se realizaron transfecciones transitorias en las células Huh-7 con los distintos plásmidos. Para esto se sembraron 200,000 células en placas de 6 pozos o bien 40,000 en placas de 24 pozos o 8,000 en placa de 96. Después de 16 horas de cultivo se realizan mezclas de transfección. Para la expresión de pCore/HCV se realiza la infección con *Vaccinia Virus* tal como se realiza durante la actividad biológica descrita anteriormente, una vez pasada la hora de infección y adicionado 1mL de medio ADMEM, se realizan las mezclas de transfección. Para la transfección se utilizó el reactivo lipofectamina 3000, según el protocolo:

- Una vez que las células estén 60-70% confluentes se realizaron las siguientes mezclas de transfección de acuerdo con la placa a utilizar:

**Tabla 2 Reactivos para la transfección transitoria mediante lipofección**

Placa	Mezcla A		Mezcla B		
	OptiMEM	Lipofectamina	OptiMEM	P3000	Plásmido
6 pozos	125 µL	3.75 µL	125 µL	2.5 µL	1µg 500 ng
24 pozos	25 µL	0.75 µL	25 µL	0.5 µL	200 ng 100 ng
96 pozos	5 µL	0.15 µL	5 µL	0.10 µL	40 ng

- Una vez realizadas las mezclas, A y B se mezclaron por inversión en un mismo tubo y se dejaron incubando a temperatura ambiente, durante 20 minutos.
- Al terminar la incubación, los pozos se transfectaron con 250, 50 y 10 µL de las mezclas por pozo en la placa de 6, 24 y 96 pozos respectivamente, según correspondió. Las mezclas fueron adicionadas por goteo y una vez finalizado, las placas se movieron para mezclar suavemente con el medio de cultivo.

4. Las células se incubaron nuevamente según el tiempo a evaluar en el siguiente ensayo.

#### 6.6. Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad de las células después de las transfecciones o tratamientos se sembraron 8,000 células por pozo en placas de 96 pozos, se realizó el tratamiento a evaluar según correspondió (Ver protocolos) y para determinar la viabilidad se siguió el siguiente protocolo del kit *Cell proliferation Kit I* (Roche):

1. Adicionar 10  $\mu$ L del reactivo MTT (Tetrazolio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a cada pozo a evaluar y se incuba durante 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
2. Al finalizar, se añaden 100  $\mu$ L del buffer de solubilización contenido en el kit.
3. La placa se incuba durante 16 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y protegido de la luz.
4. Al finalizar, la absorbancia de cada pozo se lee en un lector de placas a una longitud de onda de 600 nm.
5. La absorbancia (abs) de las células que no hayan sido tratadas (Control celular) será considerado el 100% de viabilidad y la viabilidad de las células tratadas se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

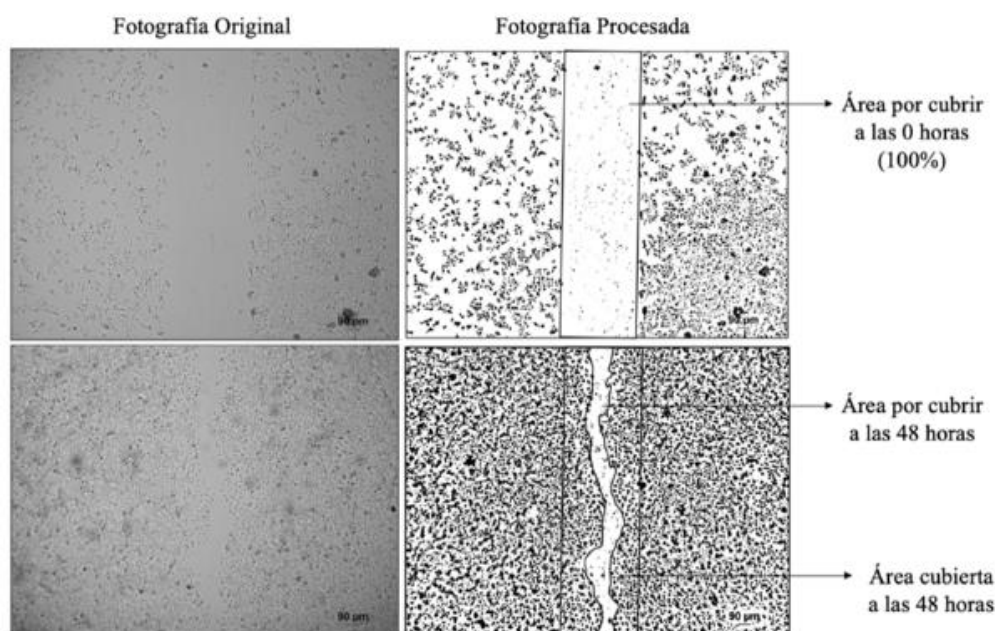
$$Viabilidad (\%) = \frac{Abs \text{ células tratadas}}{Abs \text{ Control celular}} \times 100$$

#### 6.7. Ensayo de cicatrización de herida

Para evaluar la capacidad de migración e invasión celular se realiza esta prueba de cicatrización. Para esto, se realizó el siguiente protocolo:

1. Sembrar 40,000 células Huh-7 por pozo en placas de 24 pozos e incubar durante 16 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

2. Las células se transfectan según el protocolo de transfección transitoria que le corresponda y se incuba durante 6 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
3. Se realiza un raspado vertical de la monocapa con una punta de micropipeta con capacidad de 10 µL lo más recto posible. Se toma una micrografía que corresponde al tiempo de 0 horas. Se toman micrografías a las 12, 24 y 48 horas de transfección para después evaluar el cambio el número de células presentes en el área de raspado (cicatriz).
4. Con ayuda del Software ImageJ se realizan los siguientes pasos:
  - a. Se cambia el tipo de imagen a 8 bit (Image > Type > 8 bit)
  - b. Se establece el valor de las zonas negras y el de las blancas (Process > FFT > Bandpass filter > OK)
  - c. Se pone un umbral (Image > Adjust > Threshold > a:0.60 > apply) y un filtro (Filters > Minimun > ~7)
5. Para obtener el cálculo del área cubierta por las células se toma en cuenta lo siguiente:



**Figura 14. Ejemplo del procesamiento de las micrografías para la determinación del porcentaje de cicatrización.**

6. Una vez obtenidas las distintas áreas se aplica la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de cicatrización de herida:

$$\text{Cicatrización de herida (\%)} = \frac{\text{área por cubrir (0h)} - \text{área por cubrir (48h)}}{\text{área por cubrir (0h)}} \times 100$$

### 6.8.Extracción del ARN total

Para la extracción de ARN total del cultivo celular se realizó utilizando el reactivo TRIZol (Thermo Fisher) siguiendo los pasos del fabricante:

1. Remover el medio de cultivo mediante aspiración
2. Adicionar 400  $\mu\text{L}$  de TRIZol a cada pozo de una placa de 6 para lisar las células.
3. Incubar durante 5 min en hielo y homogenizar el TRIZol en la placa hasta despegar todas las células. Después pasar las células con TRIZol a un tubo de 1.5 mL.
4. Adicionar 80  $\mu\text{L}$  de cloroformo frío. Mezclar con vórtex durante 15 segundos.
5. Incubar el tubo en hielo 5 minutos y centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C.
6. Recuperar sólo la fase acuosa en un tubo nuevo cuidando de no arrastrar contenido de la interfase y/o fase orgánica.
7. Adicionar a la fase acuosa 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío e incubar toda la noche a -20°C o 1 hora a -80°C.
8. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C.
9. Remover el sobrenadante y lavar la pastilla de ARN con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 y mezclar con vórtex.
10. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C.
11. Retirar completamente el etanol sin tocar la pastilla de ARN.
12. Resuspender la pastilla de ARN en 20  $\mu\text{L}$  de agua DEPC.
13. Antes de leer en el nanodrop la concentración obtenida, se puede calentar un poco a 50°C para asegurar la completa resuspensión.

14. Una vez que se obtiene la concentración y pureza del ARN extraído, se guarda a -20°C hasta su uso posterior.

### 6.9. Evaluación de expresión génica mediante RT-qPCR

Para obtener la expresión de los distintos marcadores se realizó una retrotranscripción (RT) con la enzima RT-MMLTV seguido de una amplificación de genes de interés mediante una PCR en tiempo real (qPCR) con el uso de SYBR green de la siguiente manera:

1. Para la RT se parte de una concentración de 200 ng/μL del ARN total extraído de las células. (2 μg del ARN total llevado a un volumen final de 10 μL con agua DEPC)
2. Una vez teniendo el ARN se realiza la siguiente mezcla de 20 μL finales en un microtubo:

**Tabla 3 Reactivos y condiciones para la retrotranscripción del ARN**

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (1rxn)	Concentración final
Random Primers	250 ng/μL	1 μL	12.5 ng/μL
dNTPs	10mM	1μL	500μM
ARN total	200 ng/μL	10μL	100 ng/μL
Colocar en termociclador a 65°C por 5 minutos			
Buffer FS	5 X	4 μL	1 X
DTT	100 mM	2μL	10 mM
RNAsa OUT	40 U/μL	1μL	2 U/μL
Colocar en termociclador a 37°C por 2 minutos			
RT-MMLV	200 U/μL	1μL	10 U/μL
Colocar en termociclador a 25°C por 10 minutos			
Colocar en termociclador a 37°C por 50 minutos			
Colocar en termociclador a 70°C por 15 minutos			



3. Una vez finalizado el programa del termociclador se tienen 100 ng/ $\mu$ L de DNA complementario, así que se realizan diluciones para dejarlo en alícuotas de 50 ng/ $\mu$ L.
4. Para realizar la amplificación de los distintos genes evaluados se hace una mezcla de un volumen final de 10  $\mu$ L con los siguientes reactivos en un microtubo:

**Tabla 4 Reactivos para la qPCR a partir del cDNA**

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (1rxn)	Concentración final
SYBR Green	2 X	5 $\mu$ L	1 X
<i>Primer FW</i>	5-10 $\mu$ M*	1 $\mu$ L	250-500 nM*
<i>Primer RV</i>	5-10 $\mu$ M*	1 $\mu$ L	250-500 nM*
cDNA	50 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	50 ng
Agua DEPC	-	2 $\mu$ L	-

\*La concentración varía dependiendo de cada gen, (ver anexos).

5. Al finalizar la mezcla de reacciones, los tubos se centrifugan y se llevan al termociclador de tiempo real bajo el siguiente programa:

**Tabla 5 Condiciones para la qPCR**

Tiempo	Temperatura	Ciclos
2 minutos	50°C	1
10 minutos	95°C	1
15 segundos	95°C	40
1 minuto	60°C	

Al terminar este programa, se agrega una curva de disociación.

6. Al finalizar, se recuperan los números de Ct de cada una de las curvas de amplificación para calcular la expresión relativa y/o número de copias.

7. Para realizar el cálculo de expresión relativa es necesario obtener la eficiencia de cada uno de los pares de oligonucleótidos siguiendo la metodología de amplificación de estándares tal como se describirá en el cálculo de número de copias.
8. Una vez obtenida la eficiencia se aplica la siguiente fórmula siguiendo el protocolo de Vandesompele (Vandesompele et al., 2002) ya que se utilizaron dos genes de referencia o endógenos en este proyecto (GAPDH y RPS18):

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{GI})^{\Delta CT_{GI}}}{\text{Media Geométrica } [(E_{REF})^{\Delta CT_{REF}}]}$$

Dónde:

E: Eficiencia

GI: Gen de interés

$\Delta CT = CT$  de muestra control -  $CT$  de muestra tratada

REF: Gen de referencia o endógeno

#### 6.10. Cálculo de número de copias de NS5A y Core del VHC

Para obtener el número de copias de transcritos de los genes NS5A y Core del VHC se realizó una curva estándar con distintas cantidades de cada uno de los plásmidos. Después se calcula el número de copias de estos estándares aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cantidad del plásmido (ng)} \times 6.022 \times 10^{23} \text{ copias/mol}}{\text{Pares de bases del plásmido} \times 660 \text{ g/mol} \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Donde:

$6.022 \times 10^{23}$  = Número de Avogadro

660g/mol = Masa de 1pb de DNA de doble cadena

$1 \times 10^9$  = Factor de conversión

Una vez aplicada la fórmula a cada uno de los estándares y calculado el logaritmo en base 10 del número de copias (necesarios para graficar) se obtuvieron los siguientes datos:

**Tabla 6 Datos de los estándares para el cálculo de número de copias**

Plásmido	Estándares (ng)	Número de copias	Log 10
pNluc-NS5A/HCV (7,694 pb)	0.03	3,557,916	6.55
	0.003	355,791	5.55
	0.0003	35,579	4.55
	0.00003	3,557	3.55
pCore/HCV (5,975 pb)	0.02	3,054,349	6.48
	0.002	305,434	5.48
	0.0002	30,543	4.48
	0.00002	3,054	3.48

Una vez realizadas las diluciones para cada uno de los estándares se realiza una qPCR de acuerdo con los datos de la **Tabla 4**. Se grafican el log 10 contra el Ct obtenido de cada uno para obtener la ecuación de la recta. Una vez obtenida, a partir de las RT-qPCR realizadas del RNA de cultivo celular se aplica la ecuación de la recta para obtener el número de copias de cada una de las muestras, cabe destacar que los Ct fueron normalizados con el promedio del Ct obtenido del gen endógeno GAPDH.

#### 6.11. Extracción de proteína total

Para poder evaluar la expresión de distintos marcadores proteicos fue necesario extraer la proteína total de los cultivos celulares. Para esto se utilizaron placas de 6 pozos en donde el medio de las células cultivadas se recolectó y las células se lavaron con 500  $\mu$ L de PBS 1X frío cada pozo, se aspiró y las células se cubrieron con 70  $\mu$ L de buffer de lisis PKR 1X (Anexos). Para despegar todas las células, se utilizó un scrapper estéril para raspar el contorno y el centro del pozo en un solo sentido a modo de coleccionar las células en todas las posiciones. Después, se transfirió la suspensión de células con buffer a un tubo de 1.5 mL, se mezcló con vortex 10 segundos y se incubó en hielo por al menos 20 min, se centrifugó 5 min a 13,000 rpm a 4°C para recuperar el sobrenadante (proteína)

transfiriéndolo a un tubo nuevo. La proteína extraída se cuantificó por el método de Bradford y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 6.12. Cuantificación de proteínas

Se determinó la concentración de proteína total extraída de los cultivos por el método de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) utilizando una curva como estándar de BSA (Sigma Life Science) como referencia, llevando a cabo el siguiente protocolo:

1. Preparar un stock de BSA a  $10\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$
2. Preparar los estándares de BSA a utilizar en la curva de cuantificación como se indica en la siguiente tabla:

**Tabla 7 Cantidades para preparar los estándares de curva de cuantificación**

<b>Estándar</b>	<b>Stock de BSA</b>	<b>Agua</b>	<b>Concentración final</b>
1	5 $\mu\text{L}$	95 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2	10 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
3	20 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
4	40 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
5	80 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

3. En una placa de 96 pozos se realiza por triplicado la mezcla de cada uno de los estándares (1  $\mu\text{L}$ ) con agua ultrapura (159  $\mu\text{L}$ ) y Bradford (40  $\mu\text{L}$ ) mezclado perfectamente bien con cuidado de no hacer burbujas.
4. Una vez mezclados todos los pozos, se cubre de la luz y se lee la absorbancia (abs) de cada uno a una longitud de 600 nm de onda.
5. Una vez obtenida la abs es graficada contra cada una de las concentraciones de los estándares para obtener la ecuación de la recta.

Una vez obtenida la ecuación de la recta, esta fue utilizada como referencia a lo largo del proyecto. Para cuantificar cada una de las muestras de proteína total extraída de

cultivo celular, se realiza una mezcla de las muestras como indica el paso 3 del protocolo anterior. A partir de la abs de cada muestra, esta es aplicada a la ecuación de la recta obtenida de los estándares para obtener la concentración final de la muestra problema.

### **6.13. Evaluación de expresión proteica mediante Western Blot**

Una vez cuantificadas las proteínas se evaluaron los distintos biomarcadores mediante western blot. Para esto primero fue necesario hacer una electroforesis de las muestras en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Se prepara un gel para el SDS-PAGE, con un gel separador y uno concentrador según el porcentaje necesario (Anexos).
2. Una vez polimerizados, se preparan 40 $\mu$ g de cada una de las muestras con buffer de carga (Anexos) en una relación 4:1 de volumen.
3. Las proteínas se desnaturalizan calentando la mezcla a 95°C por 10 minutos.
4. Una vez desnaturalizadas, las muestras se cargan al gel seguidas de un marcador de peso molecular pre-teñido y la electroforesis se inicia con ayuda del buffer de corrida (Anexos) a 100 V por 2.5 horas aproximadamente o hasta que el buffer de carga llegue al límite inferior.

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, fueron transferidas a una membrana de fluoruro de poli-vinilideno (PVDF) de 0.45  $\mu$ m. De acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Se recorta la membrana con las medidas aproximadas del gel del SDS-PAGE.
2. La membrana se activa al sumergirla con metanol al 100% y en agitación durante 5 minutos.
3. La membrana se lava con agua ultrapura durante 5 min y se sumerge en buffer de transferencia 1X (Anexos) otros 5 minutos.
4. En un recipiente se humedecen 2 papeles filtro y 2 esponjas en buffer de transferencia durante 5 minutos.

5. Se desmonta el gel del SDS-PAGE para preparar el sándwich de transferencia (esponja, papel filtro, membrana, gel, papel filtro y esponja) de manera que queden en contacto la membrana y el gel cuidando que no queden burbujas en medio.
6. Una vez formado el sándwich colocarlo en la cámara de transferencia, colocar un agitador magnético y un congelante dentro de la cámara y cubrir con buffer de transferencia.
7. La transferencia se lleva a cabo a 4°C, con agitación a 120 V o 350 mA constantes durante 150 minutos.
8. Al terminar, sacar la membrana con cuidado y verificar que el marcador de peso molecular pre-teñido se haya transferido a la membrana.
9. Desmontar el sándwich por completo y colocar la membrana en rojo de ponceau (Anexos) hasta observar las bandas rojas de las muestras problema.
10. Retirar todo el colorante, lavando la membrana con TBS-T 1X (Anexos) hasta que todas las bandas rojas desaparezcan.

Una vez lograda la transferencia se comenzó con la inmunodetección de los distintos biomarcadores siguiendo estos pasos:

1. La membrana se coloca en buffer de bloqueo (TBS-T 1X con 10% de leche) durante 30-60 minutos en agitación y temperatura ambiente.
2. Lavar la membrana con TBS-T 1X durante 5 minutos
3. Incubar la membrana en el anticuerpo primario diluido en TBS-T 1X y 5% de leche según la proteína a detectar en las muestras (Anexos) durante 16 horas en agitación y 4°C.
4. Lavar la membrana con TBS-T 1X durante 10 minutos en agitación y temperatura ambiente, 3 veces.
5. Incubar durante 2.5 horas el anticuerpo secundario diluido 1:5,000 en TBS-T 1X y 5% de leche según el anticuerpo primario utilizado (Anexos).
6. Lavar la membrana con TBS-T 1X durante 10 minutos en agitación y temperatura ambiente, 3 veces.

7. Para la detección de señal de proteína presente, se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico PLUS de acuerdo con pasos del fabricante.
8. La membrana fue revelada en un ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad).

Para obtener la expresión relativa, se necesita detectar una proteína endógena, en este caso se usaron beta-Actina y GAPDH. La señal de quimioluminiscencia fue analizada por densitometría con el software ImageJ. Para calcular la expresión en cambio del número de veces en comparación con el control, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Cambio en no. de veces} = \frac{\text{Expresión relativa de proteína de interés}}{\text{Expresión relativa de proteína endógena}}$$

Donde:

Expresión relativa de proteína de interés = Señal de interés de la muestra / Señal de interés del control.

Expresión relativa de proteína endógena = Señal endógena de la muestra / Señal endógena del control.

#### **6.14. Evaluación de expresión proteica mediante la actividad de Nano Luciferasa**

Para evaluar la expresión de la NS5A del VHC se realizó la determinación de la actividad de la nano luciferasa como reportera, incluida en el plásmido pNluc-NS5A/HCV. Para esto, teniendo las muestras de proteína total extraída de cultivo, se siguió el protocolo del kit Nano-Glo (Promega, USA):

1. Se prepara la mezcla del buffer con el sustrato de la nano luciferasa (incluidos en el kit) en una relación 50:1, tomando en cuenta que se requieren de 5  $\mu\text{L}$  por pozo de esta mezcla.
2. En una placa de 96 pozos blanca de fondo plano, se colocan 15  $\mu\text{L}$  del buffer de lisis PKR 1X (utilizado en la extracción de proteínas) por pozo.

3. Se mezclan 5  $\mu$ L de cada muestra de proteínas por pozo con el buffer PKR 1X.
4. Mezclar 5  $\mu$ L de la mezcla de buffer:sustrato (del paso 1) en cada uno de los pozos.
5. Tapar de luz y agitar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer niveles de quimioluminiscencia en el GloMax (Promega) con el protocolo de Nano-Glo.

Una vez obtenidos los niveles de quimioluminiscencia en unidades relativas de luz (RLUs) estos son comparados con la cantidad de muestra colocada en la placa para poder normalizar las RLUs por mg de proteína total.

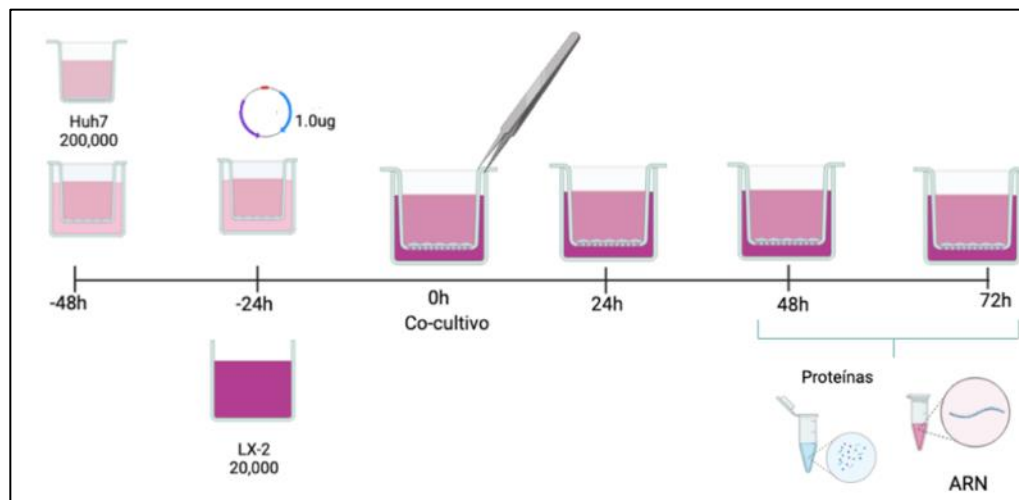
### **6.15. Co-cultivo de células Huh-7 y LX-2**

Para crear el microambiente celular entre los hepatocitos (Huh-7) y las células estelares hepáticas (LX-2) se realizó un co-cultivo con relación 10:1, en un sistema de pozos porosos (3  $\mu$ m) transwell (Thermo Fisher Scientific, USA) de la siguiente manera (**Figura 15**):

1. Dos días antes del co-cultivo se sembraron 200,000 Huh-7 en los insertos porosos utilizando 2.5 mL de medio de cultivo con ayuda de una placa de 6 pozos.
2. Después de 24 horas (un día antes del co-cultivo) se transfectaron las células Huh-7 con 1  $\mu$ g de cada plásmido de acuerdo con protocolo de transfección transitoria visto anteriormente. Por otro lado, se sembraron 20,000 LX-2 por pozo en 2.5 mL de medio sin SFB, en las placas de co-cultivo.
3. Después de 24 horas (día del co-cultivo), los insertos porosos con las células Huh-7 transfectadas son colocados en los pozos de la placa de co-cultivo que contienen las células LX-2. Este movimiento se recomienda hacer con ayuda de pinzas, muy lentamente y procurando que todo el medio de cultivo de las LX-2 se filtre por los poros de los insertos y esté en contacto con ambas líneas celulares.



Una vez pasadas 48 y 72 horas de co-cultivo se realizó una extracción de proteínas (según el protocolo visto anteriormente) de ambas líneas celulares. Asimismo, se realizó una extracción de ARN total de las células LX-2 (con TRIzol) y de las células Huh-7 con un kit comercial (como se describe posteriormente).



**Figura 15. Esquema del ensayo de co-cultivo.** Se sub-cultivaron 200,000 células Huh-7 en insertos porosos con 2.5 mL de medio de cultivo en una placa de 6 pozos dos días antes del comienzo del co-cultivo. Un día antes, las células Huh-7 se transfecaron con 1  $\mu$ g de cada plásmido. Por otro lado, se sub-cultivaron 20,000 células LX-2 por pozo con medio sin SFB en placas de co-cultivo. En el día del comienzo del co-cultivo, los insertos porosos con las Huh-7 transfectadas se colocaron en los pozos de co-cultivo con LX-2, asegurando un contacto adecuado entre ambas líneas celulares mediante un filtrado lento del medio de cultivo.

### 6.16. Evaluación de expresión génica mediante el arreglo de RT-qPCR

Para realizar un perfil de expresión génica utilizando un arreglo de PCR se partió del ARN de las células Huh-7 co-cultivadas con las células LX-2. Para esto la extracción de ARN se realizó con el kit RNeasy de QIAGEN de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Las membranas porosas de los insertos de co-cultivo son recortadas con ayuda de pinzas y puestas sobre una placa de 6 pozos nueva.
2. Se añaden 600  $\mu$ L del Buffer RLT y 6  $\mu$ L de  $\beta$ -Mercaptoetanol para lissarlas. Se mezcla muy bien con la pipeta para despegar las células, si es necesario se raspa la monocapa con ayuda de *scraper*.

3. La resuspensión de células se pasa a un tubo cónico de 1.5 mL y con ayuda de una jeringa y aguja de 0.8mm las células son disgregadas al pasarlas a través de la jeringa 10 veces.
4. Una vez disgregadas y lisadas las células, se añaden 600µL de etanol al 70% y se mezcla por pipeteo suave.
5. Se pasan de 600 en 600 µL a la columna del kit con tubo colector y se centrifuga 15 segundos a 13,000 rpm.
6. Se descarta el líquido del tubo colector y a la columna se le añaden 350 µL de buffer RW1.
7. Se centrifuga 15s a 13,000 rpm y se desecha el líquido del tubo colector.
8. Se prepara una mezcla con 10 µL de DNAsa + 70 µL de buffer RDD y la mezcla se añade a la columna, se incuba a 25°C durante 15 minutos.
9. Se agregan 350 µL del buffer RW1 a la columna y se centrifuga 15s a 13,000 rpm.
10. Se desecha el líquido del tubo colector y se añaden 500 µL de buffer RPE en la columna, se centrifuga 2 minutos a 13,000 rpm.
11. Se desecha el líquido de tubo colector y se ponen otros 500 µL de buffer RPE, se centrifugan 2 minutos a 13,000 rpm.
12. Se desecha tubo colector, se coloca uno nuevo y se centrifuga nuevamente 1 min a 13,000 rpm para asegurar que no queden restos del buffer. Hacer nuevamente con tubo nuevo si aún se observan restos en el tubo colector.
13. Se coloca un tubo cónico recolector con tapa en la columna y se le añaden 30 µL de agua libre de nucleasas a la columna. Se centrifuga 2 min a 13,000 rpm y el ARN recuperado en el tubo colector se cuantifica en el Nanodrop.

Una vez obtenido el ARN con  $\text{abs } 260/280 > 1.8$  (recomendado por el proveedor) se realiza la retrotranscripción preparando las siguientes mezclas por muestra:

**Tabla 8 Reactivos y condiciones para la retrotranscripción del arreglo de qPCR**

Reactivo	Cantidad
ARN	1 µg
Buffer GE	2 µL
Agua libre de RNAsa	Aforar a 10 µL
Colocar en el termociclador 5 min a 42°C	
Colocar en hielo 1 min	
Buffer BC3 5X	4 µL
Control P2	1 µL
RE3 RT Mix	2 µL
Agua libre de RNAsa	3 µL
Colocar en el termociclador 15 min a 42°C	
Colocar en el termociclador 5 min a 95°C	
Agua libre de RNAsa	91 µL

Una vez obtenido el cDNA se realizó la siguiente mezcla de reacción con el kit recomendado por la casa comercial QIAGEN estos valores son por muestra y se realiza en una canaleta estéril

**Tabla 9 Reactivos para el arreglo de qPCR**

Reactivo	Volumen
cDNA	1,350 µL
RT SYBR Green Rox Master Mix 2X	102 µL
Agua libre de RNAsa	1,248 µL

Se mezcló muy bien por pipeteo la mezcla, y con ayuda de una pipeta multicanal se ponen 25 µL de la mezcla en cada pozo de la placa *Human Fibrosis PAHS-120ZA RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array* (**Figura 16**) la placa se centrifugó 1 min a 1,000 g y se colocó en el termociclador de tiempo real con el programa estándar de “Absolute Quantitation” el cual incluye los siguientes ciclos:

**Tabla 10 Condiciones para el arreglo de qPCR**

Tiempo	Temperatura	Ciclos
10 minutos	95°C	1
15 segundos	95°C	40
1 minuto	60°C	

Al finalizar, se incluyó una curva de disociación y al terminar la qPCR se recuperaron los datos de Ct de cada uno de los pozos para poder ser arrojados en un archivo adecuado para el análisis de los datos mediante la plataforma *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Data Analysis* por instrucciones del proveedor. El software arroja un reporte con el análisis de los datos, el cual incluye diagramas de volcán, valores de expresión relativa y el valor de *p* realizando pruebas de T para el análisis estadístico.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	ACTA2	AGT	AKT1	BCL2	BMP7	CAV1	CCL11	CCL2	CCL3	CCR2	CEBPB	COL1A2
<b>B</b>	COL3A1	CTGF	CXCR4	DCN	EDN1	EGF	ENG	FASLG	GREM1	HGF	IFNG	IL10
<b>C</b>	IL13	IL13RA2	IL1A	IL1B	IL4	IL5	ILK	INHBE	ITGA1	ITGA2	ITGA3	ITGAV
<b>D</b>	ITGB1	ITGB3	ITGB5	ITGB6	ITGB8	JUN	LOX	LTBP1	MMP1	MMP13	MMP14	MMP2
<b>E</b>	MMP3	MMP8	MMP9	MYC	NFKB1	PDGFA	PDGFB	PLAT	PLAU	PLG	SERPINA1	SERPINE1
<b>F</b>	SERPINH1	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMAD6	SMAD7	SHN1	SP1	STAT1	STAT6	TGFB1	TGFB2
<b>G</b>	TGFB3	TGFB1	TGFB2	TGIF1	THBS1	THBS2	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	TNF	VEGFA
<b>H</b>	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Genes endógenos

Control DNA Genómico

Controles de retrotranscripción

Controles positivos de PCR

Genes de interés

**Figura 16. Diseño de la placa del *Human Fibrosis PAHS-120ZA RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array*.** Contiene 84 pozos destinados a los genes de interés. Los pozos para 5 genes endógenos incluidos en la placa permiten la normalización de los datos. El control de ADN genómico (HGDC) detecta específicamente la contaminación por ADN genómico no transcrito con un alto nivel de sensibilidad. El control de transcripción inversa (RTC) prueba la eficacia de la reacción de transcripción inversa realizada con el *kit RT<sup>2</sup> First Strand* mediante la detección de la plantilla sintetizada a partir del control de ARN externo integrado en el kit. El control positivo de PCR (PPC) consiste en una secuencia de ADN artificial preañadida y el ensayo que la detecta. Este control prueba la eficacia de la propia reacción de PCR. Los controles proporcionados en réplicas se pueden utilizar para probar la reproducibilidad intraplaca entre pocillos.

### 6.17. Análisis bioinformáticos de genes diferencialmente expresados

Una vez obtenidos los datos del perfil de expresión en las células Huh-7 en co-cultivo con las LX-2 se realizaron análisis bioinformáticos de los genes diferencialmente expresados en los distintos tiempos de co-cultivo con las plataformas en línea: Enrichr

disponible en <https://maayanlab.cloud/Enrichr/> (Xie et al., 2021) y STRING version 12.0 disponible en <https://string-db.org/> (Szklarczyk et al., 2023). Estos análisis nos permitieron obtener la ontología de genes, señalando la función molecular, componente celular y el proceso biológico más enriquecido de acuerdo con el perfil de expresión diferencial. Así mismo, Enrichr y STRING dan información acerca de las vías de señalización favorecidas de acuerdo con el perfil de expresión. Adicionalmente, STRING brinda información y un mapa del interactoma de las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados, así como la vía de señalización en la que participa dicha interacción. Además del mapa de interactoma, todos los resultados se obtienen con valores numéricos y nivel de significancia de acuerdo con el nivel de enriquecimiento, que posteriormente fueron graficados.

#### **6.18. Silenciamiento de PAI-1 en células Huh-7**

Para evaluar la participación del inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), se decidió utilizar un RNA de interferencia pequeño (siRNA) validado para bajar la expresión de PAI-1 (*SERPINE1 Silencer validated siRNA* ID:is10013, Ambion) y evaluar sus efectos en la TEM de las células Huh7 después de 24 horas de ser transfectadas con los plásmidos pNluc-NS5A/HCV o pCore/HCV como se describió anteriormente. Asimismo, se utilizó un siRNA control (*Silencer select Negative Control #1 siRNA*, Ambion) para ser utilizado como control (scramble) en este tipo de ensayos. El silenciamiento se llevó a cabo mediante transfección con lipofección como se describe a continuación: Se sembraron 200,000 células Huh7 en placas de 6 pozos o bien 40,000 en placas de 24 pozos o 8,000 en placa de 96. Después de 16 horas de cultivo se realizaron las transfecciones transitorias para expresar las proteínas virales como se describió anteriormente. Después de 24 horas de transfección se realizaron las siguientes mezclas de transfección para el silenciamiento:

**Tabla 11 Reactivos para la transfección de silenciamiento mediante lipofección**

Placa	Mezcla A		Mezcla B	
	OptiMEM	Lipofectamina	OptiMEM	siRNAs
6 pozos	125 $\mu$ L	3.75 $\mu$ L	125 $\mu$ L	5nM
24 pozos	25 $\mu$ L	0.75 $\mu$ L	25 $\mu$ L	5nM
96 pozos	5 $\mu$ L	0.15 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5nM

Todas las cantidades es por pozo a transfectar

1. Una vez realizadas las mezclas, A y B se mezclan por inversión en un mismo tubo y se dejan incubando a temperatura ambiente, durante 20 minutos.
2. Al terminar la incubación, los pozos se transfectan con 250, 50 y 10  $\mu$ L de las mezclas por pozo en la placa de 6, 24 y 96 pozos respectivamente, según corresponda. Las mezclas deberán ser adicionadas por goteo y una vez finalizado, las placas se mueven para mezclar suavemente con el medio de cultivo.
3. Las células se incuban nuevamente según el tiempo a evaluar en el siguiente ensayo.

Para evaluar el efecto del silenciamiento, después de 24 y 48 horas se realizaron ensayos de Western Blot y se determinaron los cambios en la expresión de cada uno de los marcadores de TEM, como se describió anteriormente.

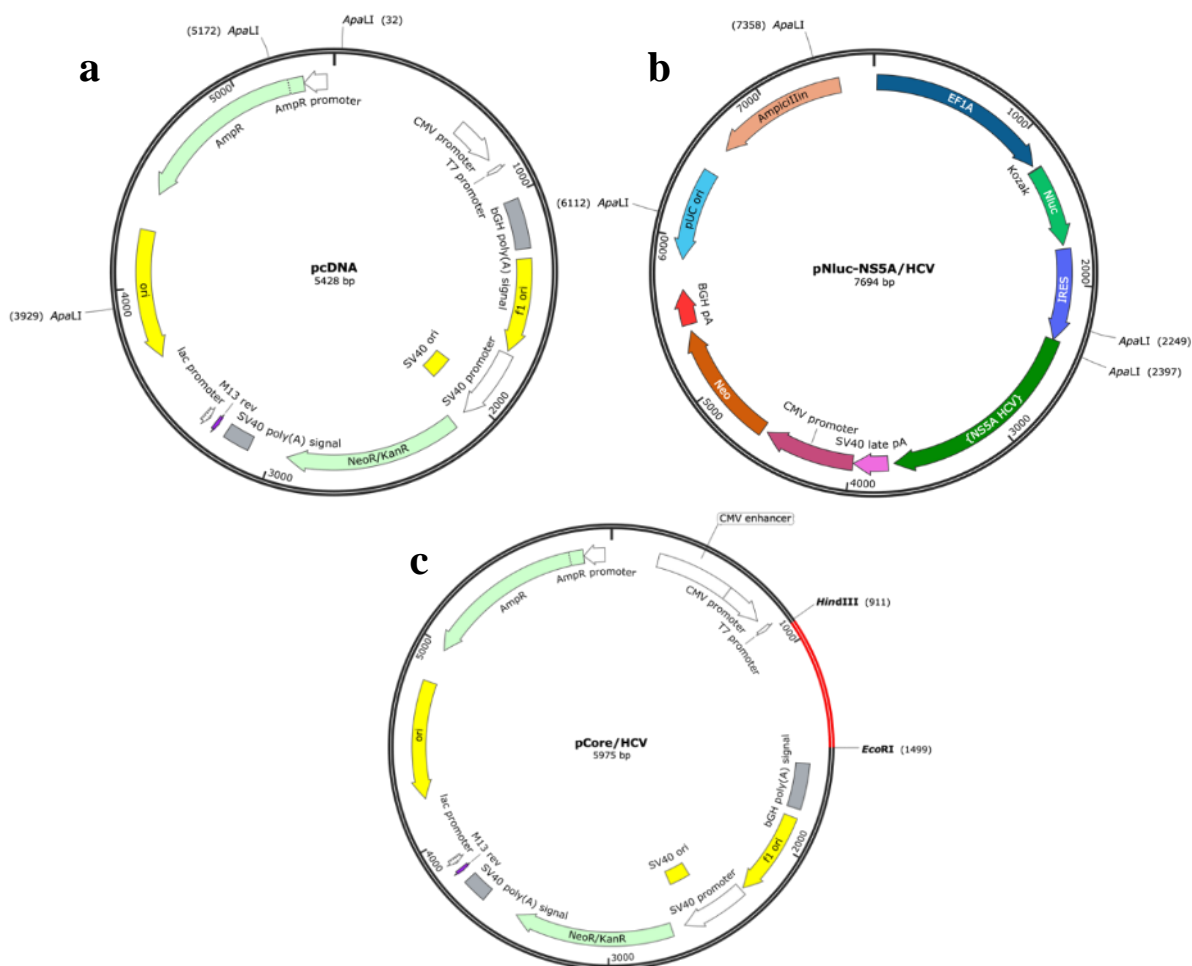
#### **6.19. Inhibición de la actividad de PAI-1 en células Huh-7**

Para evaluar la participación del inhibidor del activador de plasminógeno 1, se decidió utilizar un inhibidor de la formación del complejo PAI-1 con uPA, el TM5275. Este inhibidor es disuelto en DMSO quedando a una concentración de 3mM. Para los ensayos de inhibición, primero se sub-cultivaron y se transfectaron células Huh7 como se describió anteriormente. Después de 24 horas de transfección las células fueron tratadas con TM5275 a una concentración final de 25 $\mu$ M. En estos casos, se añadió un grupo de estudio sólo con el vehículo de DMSO. Para evaluar el efecto de esta inhibición se realizaron ensayos de qPCR y Western Blot y se determinaron los cambios en la expresión de cada uno de los marcadores de TEM, como se describió anteriormente.

## 7. RESULTADOS

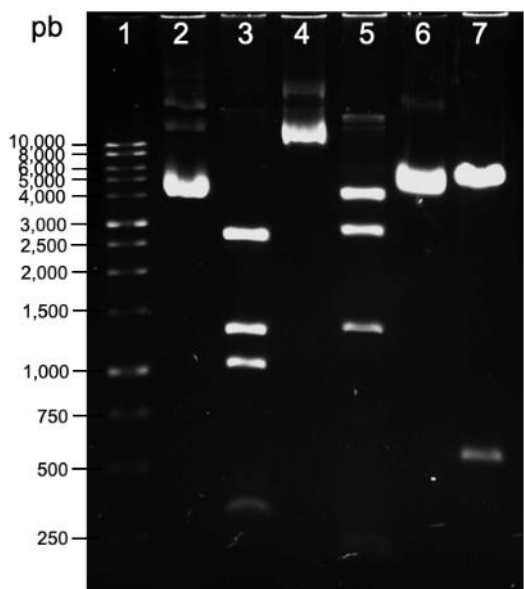
### 7.1. Diseño y caracterización de plásmidos

Se realizó el diseño y caracterización de los plásmidos pcDNA, pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV de manera *in silico* obteniéndose distintos cortes en cada uno de los plásmidos tal como se muestra en la **Figura 17**.



**Figura 17.** Diseño y caracterización *in silico* de los plásmidos. a) Diseño del plásmido pcDNA y caracterización con la enzima *ApaI*. b) Diseño del plásmido pNluc-NS5A/HCV y caracterización con la enzima *ApaI*. c) Diseño del plásmido pCore/HCV y caracterización con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Para la caracterización de los plásmidos pcDNA, pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV, inicialmente, se crecieron bacterias *E. coli DH5 $\alpha$* , se transformaron con cada uno de los plásmidos y finalmente se extrajeron mediante lisis alcalina. Una vez extraídos, los plásmidos fueron caracterizados mediante cortes con enzimas de restricción. Los plásmidos completos, así como los distintos cortes generados fueron corridos en un gel de agarosa al 2% para lograr observar la conformación y caracterización de cada uno de los plásmidos como se muestra y se describen en la **Figura 18** y la **Tabla 12** respectivamente.



**Tabla 12. Electroforesis en gel correspondiente a la caracterización de plásmidos.**

Carril	Plásmido	Enzima	Fragmentos (bp)
2	pcDNA	-	5,428
3		<i>ApaLI</i>	2,897
			1,211
			1,032
4	pNluc-NS5A/HCV	-	7,694
5		<i>ApaLI</i>	3,715
			2,585
			1,246
6	pCore/HCV	-	5,975
7		<i>HindIII</i>	5,387
			<i>EcoRI</i>

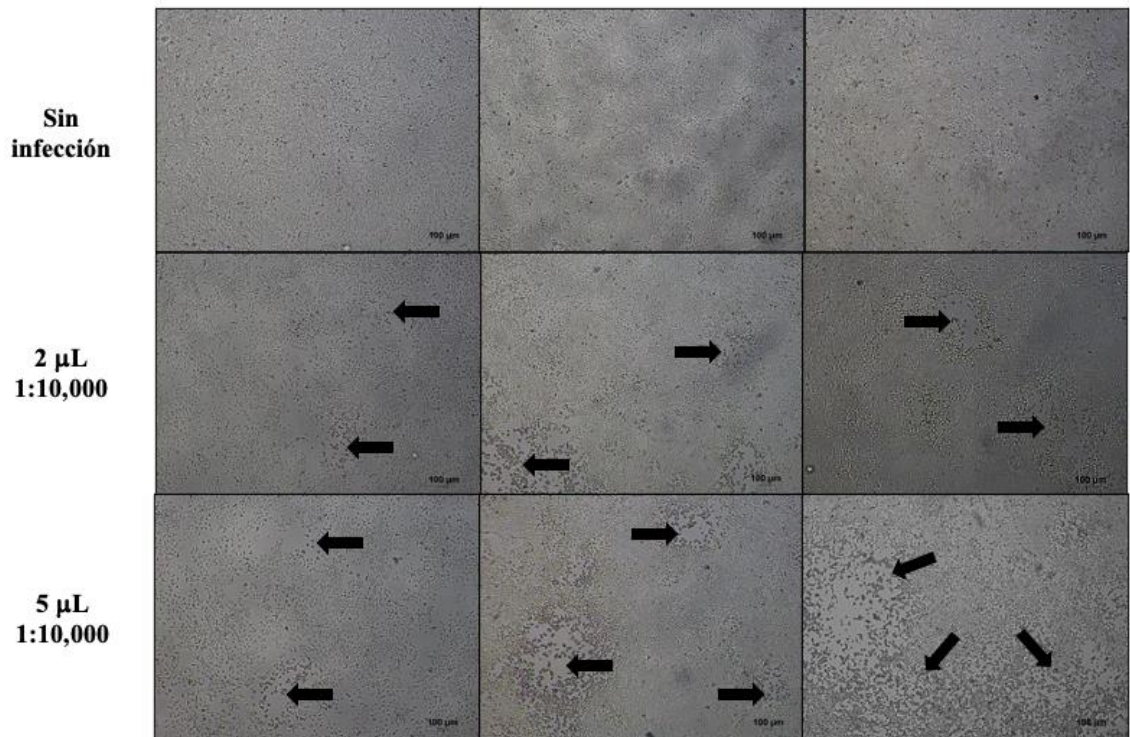
**Figura 18. Caracterización de plásmidos pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con cada uno de los plásmidos como se describe en la **Tabla 12**.

## 7.2. Sistema de expresión transitoria de las proteínas NS5A y Core del VHC.

Una vez caracterizados los plásmidos, fueron utilizados para transfectar células Huh-7 con pcDNA (como control), pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV. Primeramente, para poder establecer el sistema de expresión de la proteína Core/HCV fue necesaria la infección con el virus *Vaccinia*. Para determinar la cantidad de virus a usar en la transfección fue necesario realizar el ensayo de actividad biológica en las células Huh-7. En la **Figura 19** se muestra el efecto citopático del virus *Vaccinia* generado en las células

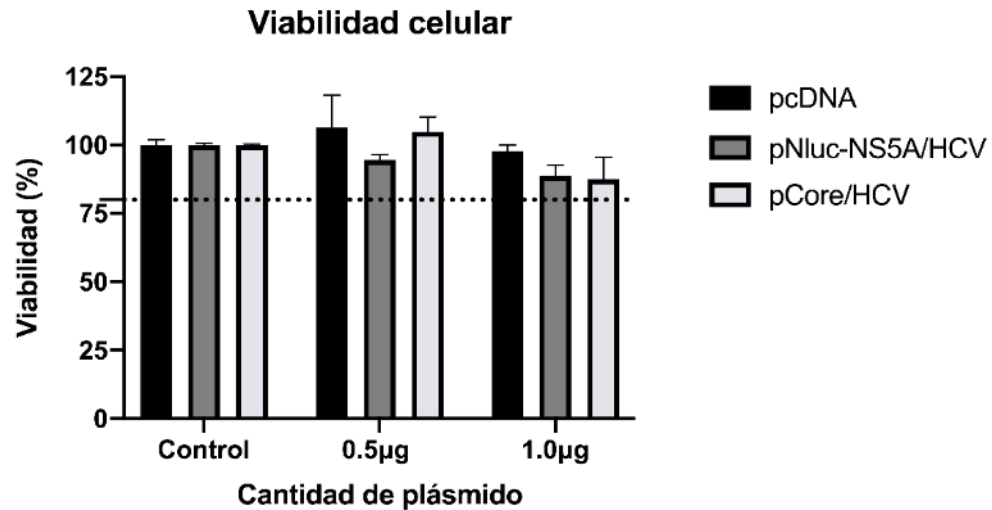


a distintos tiempos de infección y con distintas cantidades del stock viral. Se decidió trabajar con 2  $\mu$ L de una dilución 1:10,000 del stock viral en los ensayos de transfección transitoria posteriores ya que la infección estaba presente desde las 48 horas sin llegar a presentar un efecto citopático muy elevado hasta las 96 horas, siendo este último el tiempo máximo para futuros ensayos de transfección.



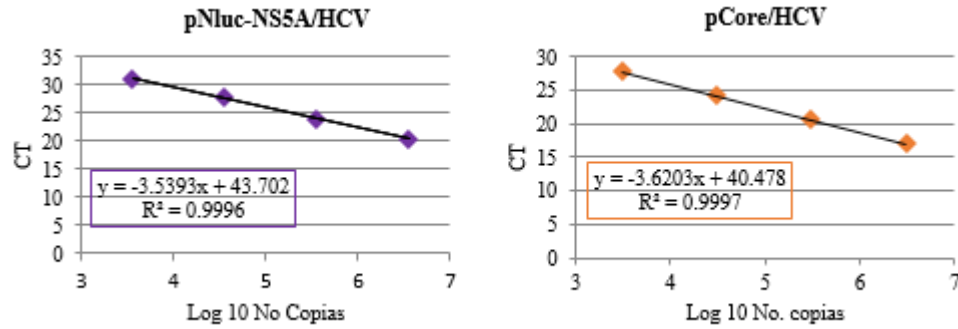
**Figura 19. Actividad biológica del virus *Vaccinia* en células Huh-7.** Se demuestra la actividad biológica del virus *Vaccinia* en células Huh-7 a distintos tiempos de infección y con diferentes cantidades del stock viral utilizado. Las flechas negras indican los focos de infección más evidentes. El ensayo se realizó tres veces de manera independiente.

Seguido de esto, se realizaron ensayos de viabilidad celular, esto para determinar si las cantidades de plásmido transfectado inducían efectos citotóxicos en las células Huh-7. Cabe resaltar que el ensayo de MTT se llevó hasta las 96 horas, ya que sería el mayor tiempo de transfección planeado en ensayos posteriores. El porcentaje de viabilidad determinado en cada uno de los grupos de transfección permaneció dentro del 85%, lo que nos indicó que era seguro trabajar con cualquiera de estas cantidades sin causar citotoxicidad en las células (**Figura 20**).



**Figura 20. Viabilidad de Huh7 a las 96 horas de transfección mediante lipofección.** Se transfectaron células Huh7 con distintas cantidades de cada uno de los plásmidos y se midió la viabilidad celular mediante ensayo de MTT a las 96 horas de transfección. Como control de pcDNA y pNluc-NS5A/HCV se tomó en cuenta la viabilidad con el vehículo de transfección. Como control de pCore se tomó en cuenta, la viabilidad de Huh7 infectadas y con el vehículo de transfección. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA una vía.

Para validar la expresión de las proteínas virales, se realizaron las transfecciones con 0.5 y 1.0  $\mu$ g de pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV, así como con 1.0  $\mu$ g de pcDNA (utilizado como control). A las 24 y 48 horas de transfección, se realizó extracción de ARN y proteína total para validar la expresión de las proteínas virales. La expresión de NS5A y Core se determinó mediante el cálculo del número de copias transcritas obtenidas por RT-qPCR, y por la actividad de nanoluciferasa (para NS5A) y el análisis densitométrico del Western Blot (para Core). Para realizar el cálculo de número de copias fue necesario obtener la ecuación de la recta derivada de la curva estándar con las diluciones de cada uno los plásmidos mediante qPCR como se describió en la metodología. Las gráficas de curva estándar de pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV, así como la ecuación obtenida se muestran en la **Figura 21**.

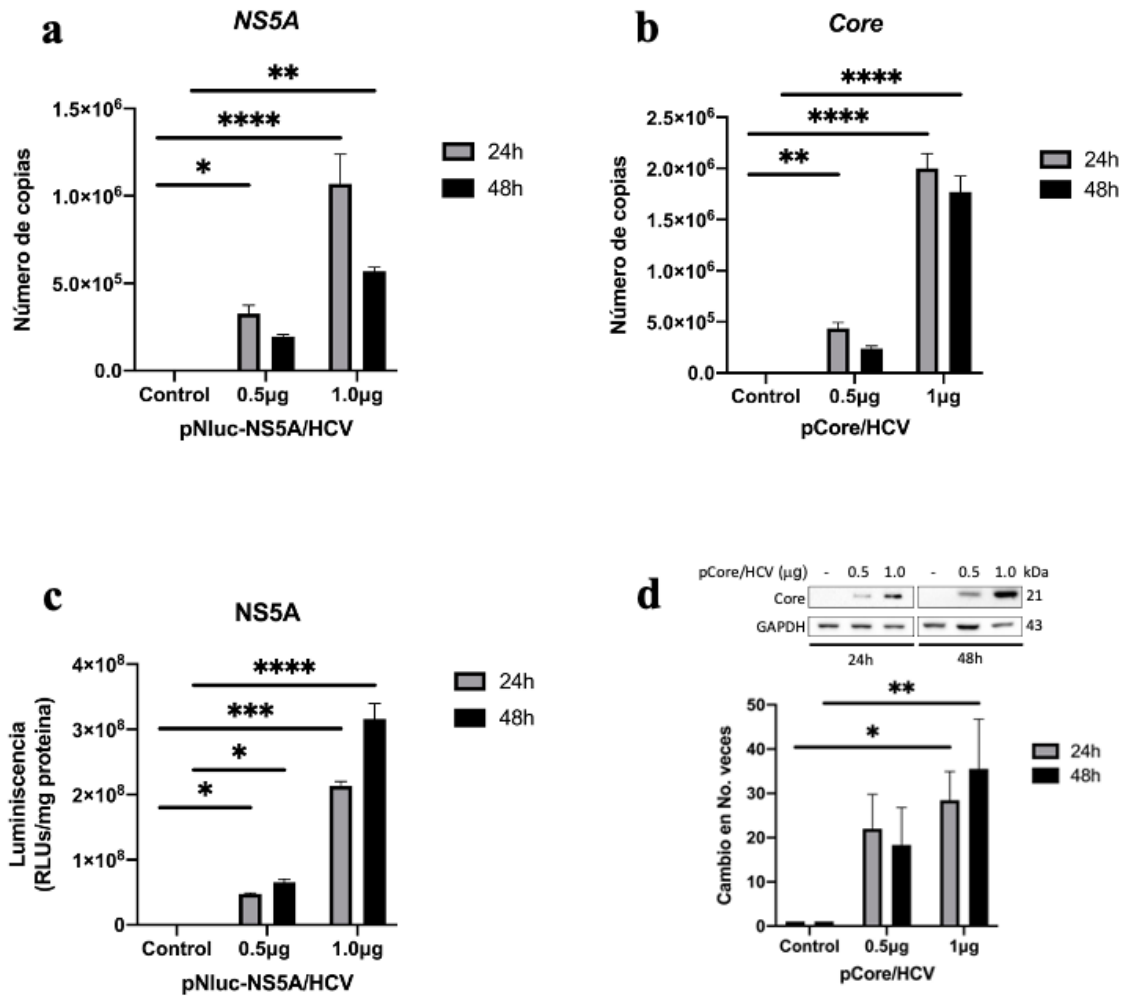


**Figura 21. Curva estándar de plásmidos pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV**

Una vez obtenida la ecuación, se realizó el cálculo del número de copias de pNluc-NS5A/HCV y de pCore/HCV obtenidas mediante RT-qPCR del ARN extraído a las 24 y 48 h de transfección en las Huh7. El número de copias de pNluc-NS5A/HCV y de pCore/HCV fue ausente en el control, y fue proporcional a la cantidad transfectada, obteniéndose hasta  $1.06 \times 10^6$  copias de *NS5A* y  $2 \times 10^6$  de *CORE* con  $1.0 \mu\text{g}$  de cada uno de los plásmidos (**Figura 22a y b**).

Por otro lado, la expresión traduccional de NS5A y Core estuvo ausente en el control, fue proporcional a la cantidad de plásmido transfectado y ambas proteínas fueron mayormente expresadas a las 48 h de transfección obteniéndose hasta  $3 \times 10^8$  RLU de la actividad de nanoluciferasa con  $1.0 \mu\text{g}$  de pNluc-NS5A/HCV y una expresión de Core de hasta 35 veces con  $1.0 \mu\text{g}$  de pCore/HCV, esto en comparación con sus respectivos controles (**Figura 22c y d**).

Con estos resultados se logró validar y así establecer el sistema de expresión transitoria de las proteínas NS5A y Core del VHC en la línea celular Huh7 necesaria para los ensayos posteriores.

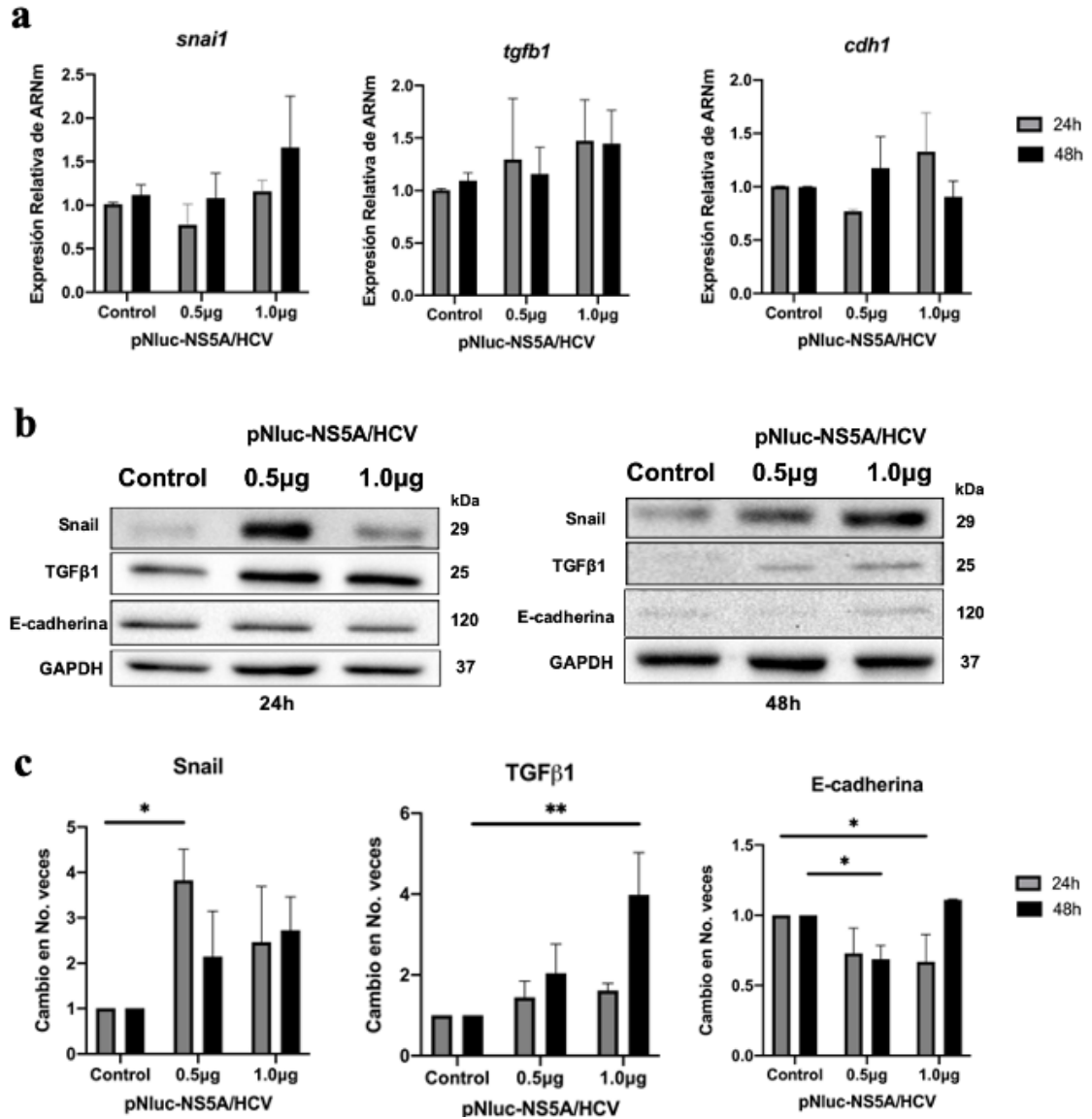


**Figura 22. Expresión de Nluc-NS5A/HCV y Core/HCV a distintos tiempos de transfección en células Huh7.** a) Expresión transcripcional de NS5A evaluada mediante el cálculo de No. de copias por RT-qPCR. b) Expresión transcripcional de Core evaluada mediante el cálculo de No. de copias por RT-qPCR. c) Nivel de proteína de la Nluc-NS5A evaluada mediante la actividad de la Nanoluciferasa. d) Expresión traduccional de Core evaluada mediante Western Blot. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías, donde  $*=p \leq 0.05$ ,  $**=p \leq 0.01$ ,  $***=p \leq 0.001$  y  $****=p \leq 0.0001$ .

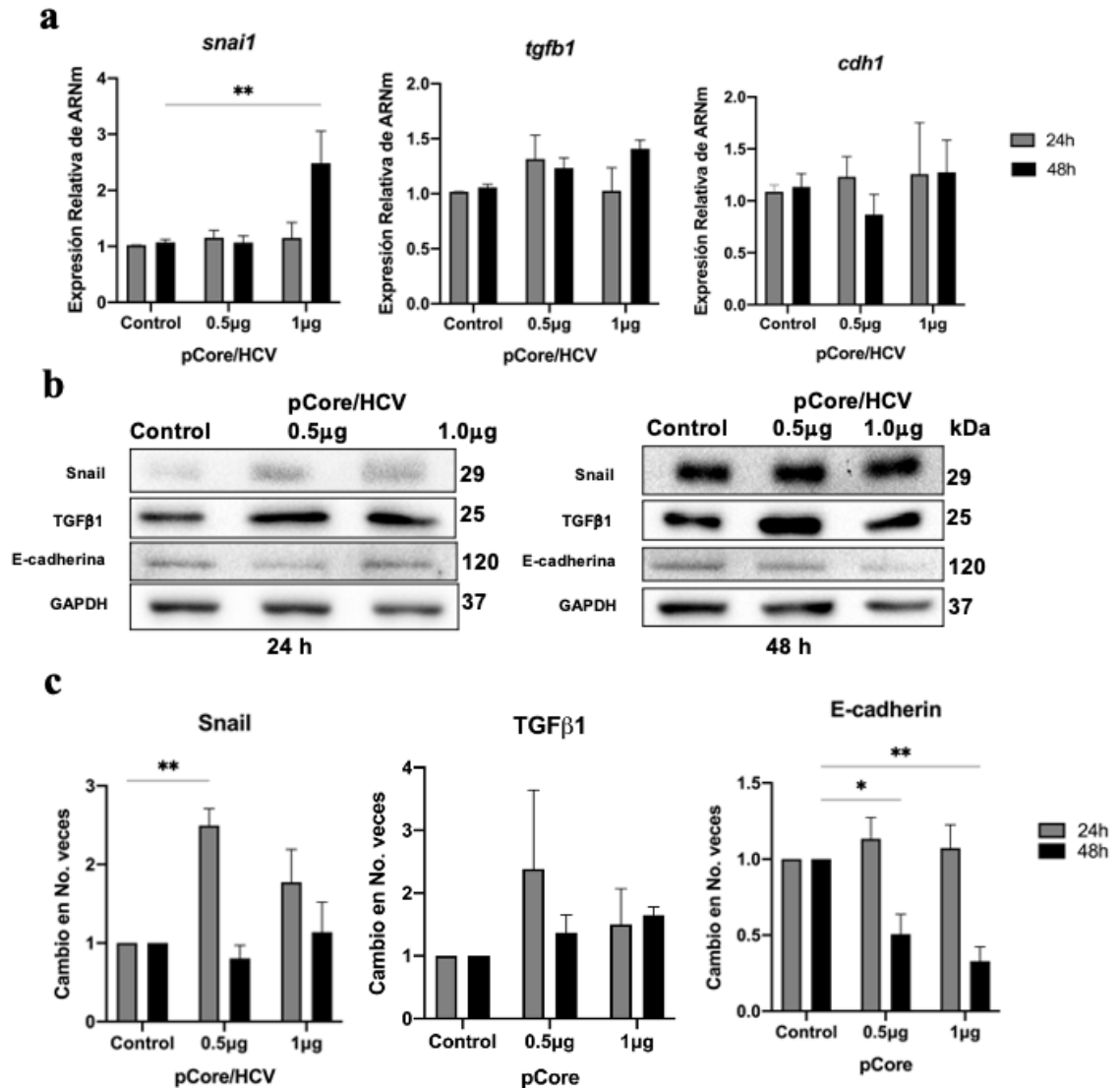
### 7.3. Expresión de marcadores de la Transición Epitelial-Mesenquimal inducidos por la proteína NS5A y Core del VHC.

Una vez establecido el sistema de expresión transitoria de NS5A y Core del VHC en las células Huh7, se evaluó la expresión de los biomarcadores de la TEM de las células Huh7-NS5A y Huh7-Core a las 24 y 48 de transfección con 0.5 y 1.0  $\mu\text{g}$  del plásmido pNluc-NS5A/HCV.

Los marcadores de la TEM fueron determinados a partir de las muestras analizadas anteriormente (**Figura 22a-d**). De la misma manera, se analizó la expresión relativa de algunos de los biomarcadores de la TEM, incluyendo a Snail, TGF $\beta$ 1 y E-cadherina. En cuanto a las Huh7-NS5A, la expresión relativa a nivel de ARNm indicó que *snail* y *tgfb1* tuvieron una tendencia a aumentar a medida que se aumentaba el pNluc-NS5A/HCV transfectado tanto a las 24 como a las 48 horas de transfección y comparado con el control. Sin embargo, es importante mencionar que al realizar el análisis estadístico no se encontró una diferencia significativa. Asimismo, no se encontró ningún cambio significativo del nivel de ARNm de *cdh1* en ninguno de los grupos y horas de transfección. Por otro lado, al analizar la expresión de proteína mediante Western Blot y análisis densitométrico se encontró un aumento en las Huh7-NS5A de 3.8 veces de Snail (con 0.5  $\mu\text{g}$  del plásmido y a las 24 horas de transfección) y de 3.9 veces de TGF $\beta$ 1 (únicamente a las 48 horas de transfección y con 1  $\mu\text{g}$  de plásmido), ambas proteínas con relación a la expresión del grupo control (**Figura 23**). Por otro lado, en cuanto a las Huh7-Core, la expresión relativa a nivel de ARNm indicó que solo *snail* aumentó 2.48 veces y de manera significativa en comparación con el control a las 48 horas de transfección. Asimismo, los niveles de proteína de snail se encontraron elevados 2.49 veces en las Huh7-Core a las 24 horas de transfección, en comparación con el control. Por otro lado, el nivel de proteína de la E-cadherina disminuyó a 0.5 veces con 0.5  $\mu\text{g}$  y disminuyó a 0.3 veces con 1  $\mu\text{g}$  de pCore/HCV a las 48 horas de transfección, comparándolo con los niveles en el control (**Figura 24**).



**Figura 23. Expresión de biomarcadores de la transición epitelial mesenquimal en células Huh7-NS5A a las 24 y 48 horas de transfección con pNluc-NS5A/HCV.** a) Expresión relativa de *tgfb1*, *snai1* y *cdh1* normalizado con *actb* y *gapdh* evaluado mediante RT-qPCR. b) Nivel de proteína de TGFβ1, Snail y E-cadherina normalizado con GAPDH y evaluado mediante western blot. c) Nivel de proteína relativa en las Huh7-NS5A evaluada mediante análisis densitométrico del western blot normalizado con el grupo control. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías, donde  $*=p\leq 0.05$  y  $**=p\leq 0.01$ .



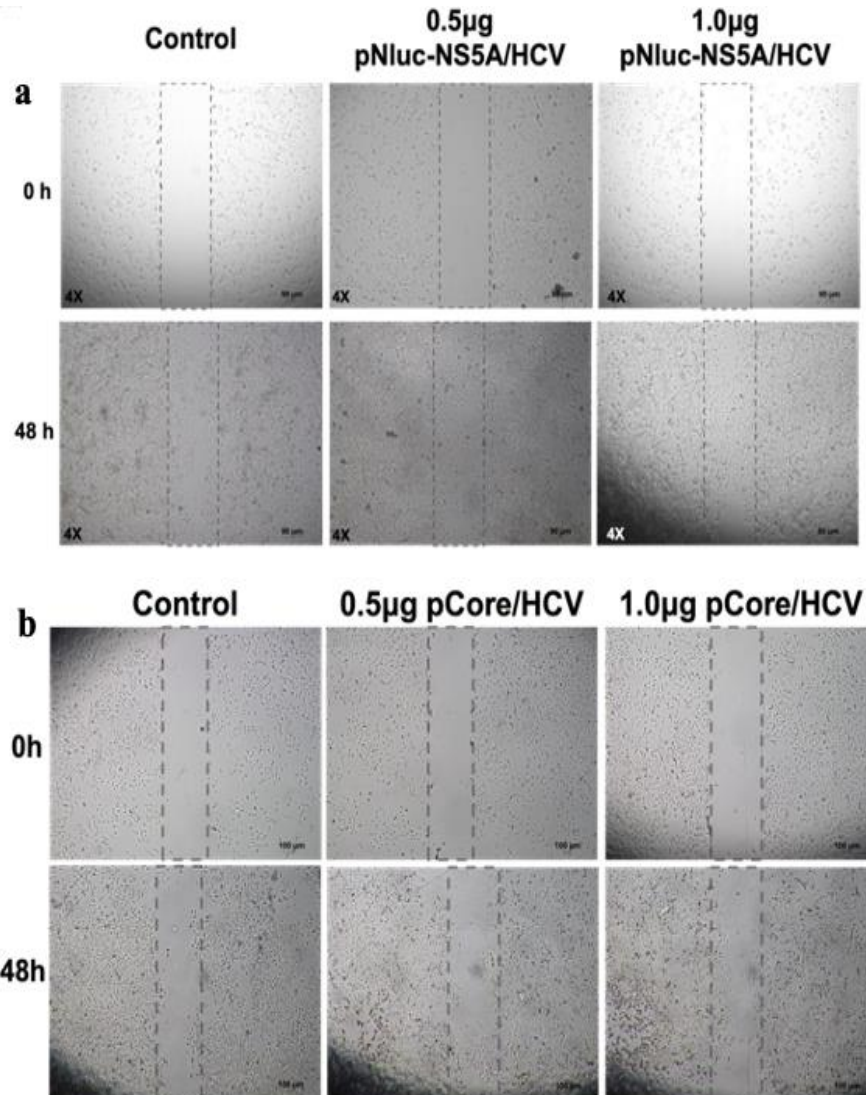
**Figura 24. Expresión de biomarcadores de la transición epitelial mesenquimal en células Huh7-NS5A a las 24 y 48 horas de transfección con pCore/HCV.** a) Expresión relativa de *tgfb1*, *snai1* y *cdh1* normalizado con *actb* y *gapdh* evaluado mediante RT-qPCR. b) Nivel de proteína de TGFβ1, Snail y E-cadherina normalizado con GAPDH y evaluado mediante western blot. c) Nivel de proteína relativa en las Huh7-NS5A evaluada mediante análisis densitométrico del western blot normalizado con el grupo control. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías, donde  $*=p\leq 0.05$  y  $**=p\leq 0.01$ .

Esta regulación en los marcadores de la transición epitelial-mesenquimal sugieren que dicho proceso se puede estar induciendo por la expresión de las proteínas virales.



#### 7.4. Capacidad de migración inducida por la proteína NS5A y Core del VHC en células Huh7.

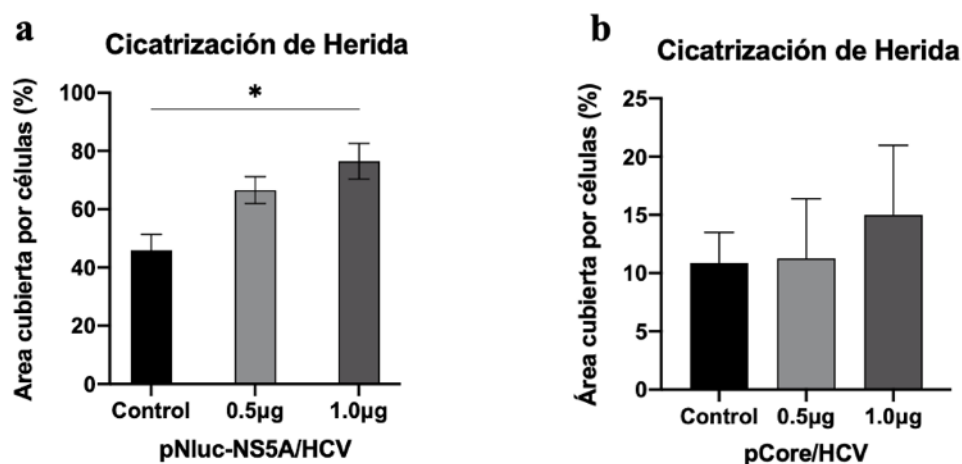
Durante la transición epitelial-mesenquimal, la célula va adquiriendo capacidad migratoria de acuerdo con la pérdida de algunas proteínas de adhesión intercelular y con los componentes de la MEC. Para evaluar la capacidad migratoria inducida por la expresión de la proteína NS5A y Core del VHC, se realizó un ensayo de cicatrización de herida.



**Figura 25. Capacidad de migración inducida por la proteína NS5A y Core del VHC en células Huh7.** a) Migración de células Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y b) transfectadas con pCore/HCV a las 48 horas de transfección y de raspado evaluado mediante el ensayo de cicatrización de herida. Los recuadros con línea punteada representan el 100% del área de la herida realizada a las 0 horas.



De acuerdo con análisis con el software Image J realizado a partir de las micrografías del ensayo de cicatrización de herida mostradas en la **Figura 25**, se observó que las células transfectadas con 1µg de pNluc-NS5A/HCV mostraron un aumento estadísticamente significativo con un 76.4 % del área de la cicatriz cubierta por las células, comparado con un 45.9 % del control. Asimismo, se observó una tendencia a aumentar el porcentaje del área cubierta por las células transfectadas con pCore/HCV en relación con la cantidad de plásmido transfectado, sin embargo, el aumento no mostró una significancia estadística (**Figura 26**).



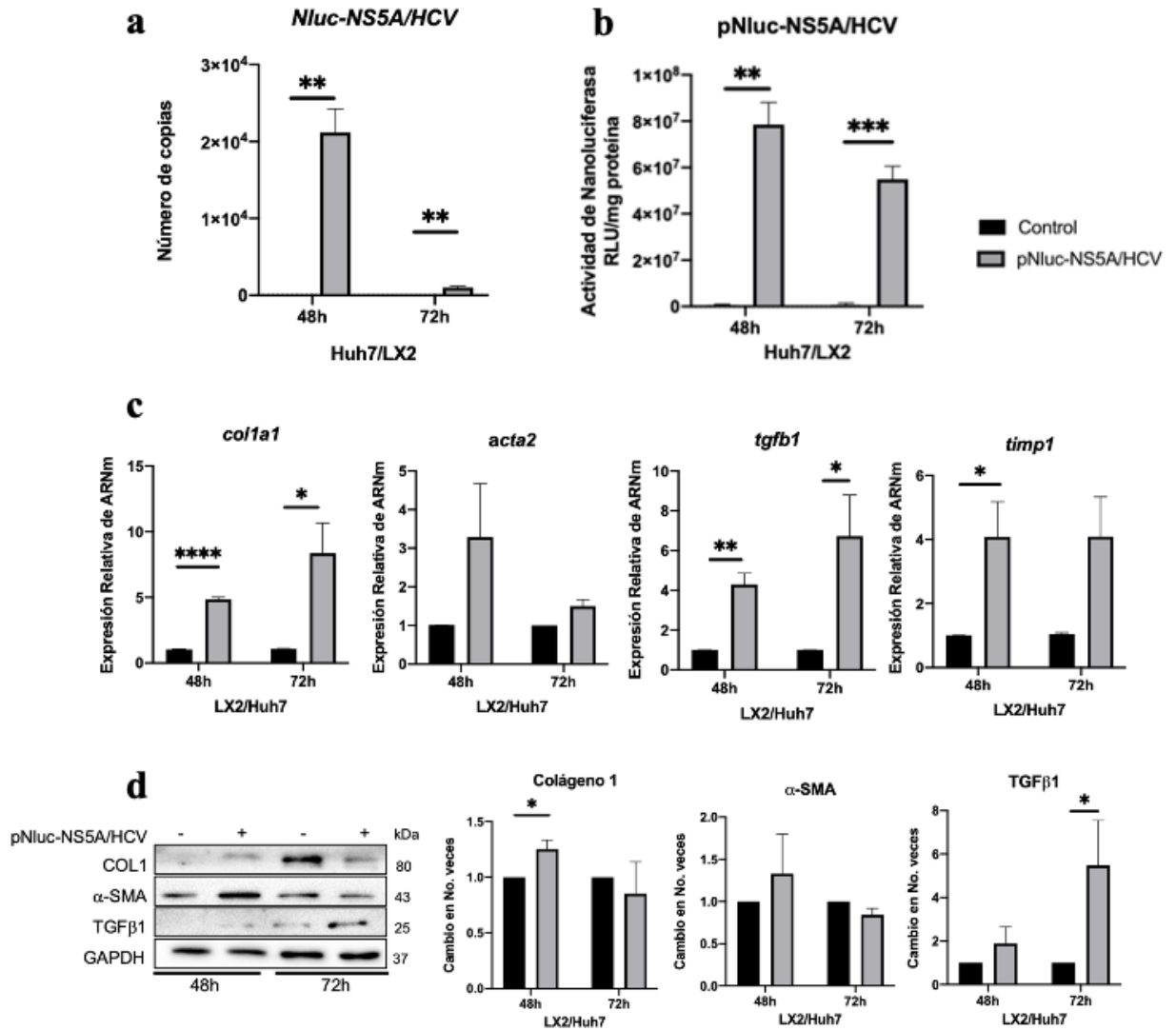
**Figura 26. Porcentaje de la capacidad de migración inducida por la proteína NS5A y Core del VHC en células Huh7.** a) Análisis de migración de células Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y b) transfectadas con pCore/HCV a las 48 horas de transfección y de raspado evaluado mediante el ensayo de cicatrización y analizado con el software ImageJ. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, donde  $*=p \leq 0.05$ .

Una vez evaluados todos los parámetros que indican una transición epitelial mesenquimal, se determinó cómo la expresión de la proteína NS5A y Core del VHC puede llegar a activar a células estelares hepáticas en un mismo microambiente celular.

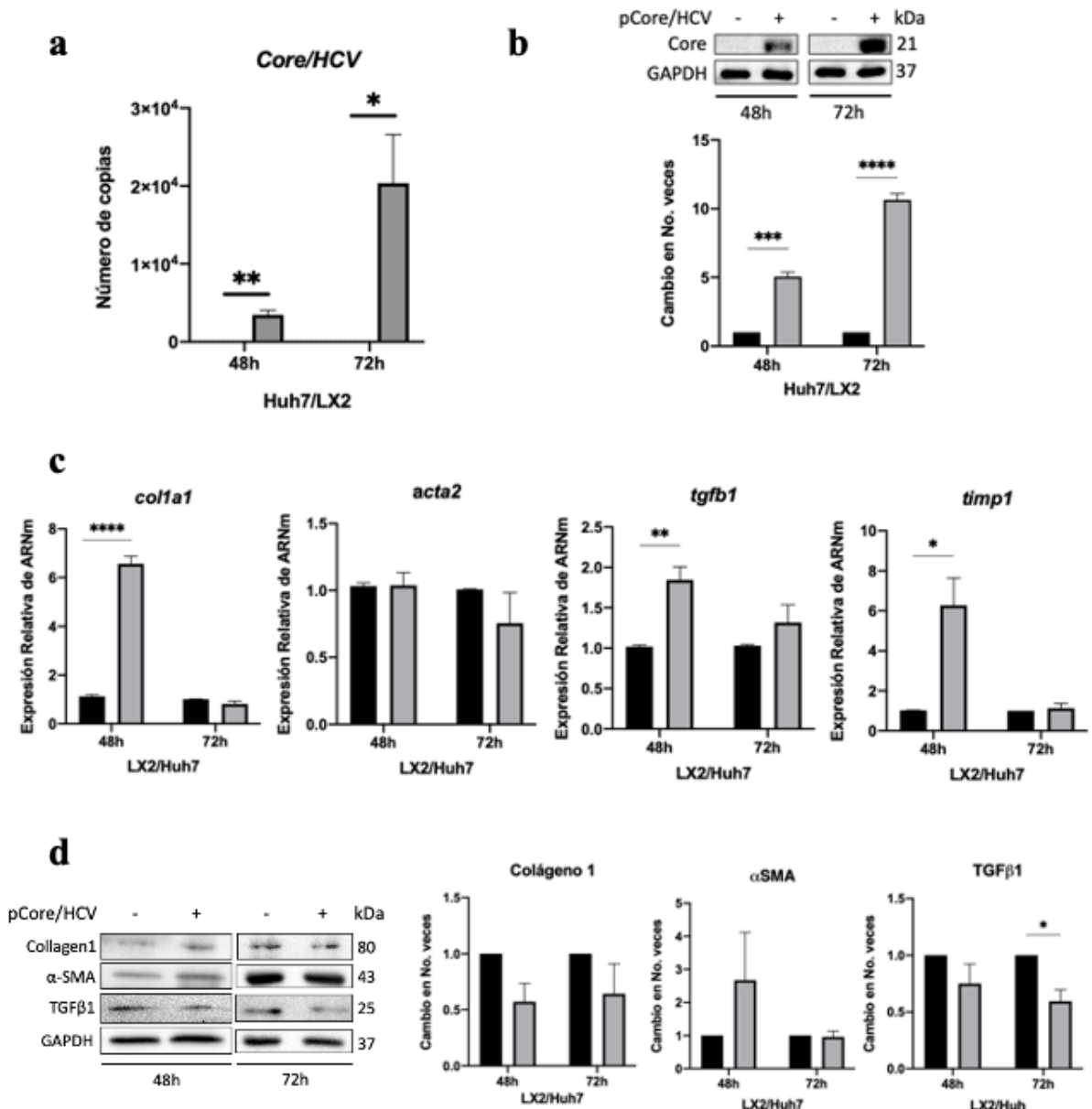
### 7.5. Activación de células estelares hepáticas LX2 inducida por el co-cultivo con células Huh7 que expresan la proteína NS5A y Core del VHC.

Otro de los procesos más importantes para la fibrogénesis es la activación de células estelares hepáticas, ya que al pasar por este proceso comienzan a producir componentes de la matriz extracelular lo que puede llegar a generar tejido fibrótico, si esta activación no está regulada. Para determinar la participación de las proteínas virales en la activación de CEH LX2, se evaluó el efecto de la expresión de NS5A y de Core en células Huh7 sobre la activación de células estelares hepáticas humanas LX2. Las células Huh7 se transfectaron con pNluc-NS5A/HCV o pCore/HCV durante 24 horas y se co-cultivaron con células LX2 (libres de SFB) durante 48 y 72 horas. Inicialmente, se confirmó el aumento de la expresión transcripcional y traduccional de NS5A y de Core en células Huh7 co-cultivadas (**Figura 27a-b** y **Figura 28a-b** respectivamente). Seguido de esto, se evaluó la expresión relativa de biomarcadores de activación de CEH en las células LX2 co-cultivadas.

En el caso de las células Huh7-NS5A, se detectó un aumento de 4.8, 4.3 y 4 veces en la expresión relativa del ARNm de *coll*, *tgfb1* y *timp1* respectivamente a las 48 horas y un aumento de 8.3 y 6.7 de *coll* y *tgfb1* respectivamente a las 72 horas en las LX2 co-cultivadas con Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV, todo esto en comparación con la expresión de Huh7 control (**Figura 27c**). Por otra parte, se detectó un aumento de 1.2 veces en la expresión relativa proteica del colágeno a las 48 horas, y un aumento de 5.4 veces del TGFβ1 a las 72 horas, de igual forma comparándolo con la expresión obtenida en el control (**Figura 27d**). En el caso de las Huh7-Core, se detectó un aumento de 6.5, 1.8 y 6.2 veces en la expresión relativa del ARNm de *coll*, *tgfb1* y *timp1* respectivamente en las LX2 a las 48 horas de co-cultivo con Huh7 transfectadas con pCore/HCV (**Figura 28c**). Por otra parte, se detectó una disminución de 0.6 veces en la expresión relativa proteica del TGFβ1 a las 72 horas de co-cultivo con Huh7 transfectadas con pCore/HCV todo esto en comparación con la expresión de Huh7 control (**Figura 28d**).



**Figura 27. Efecto de NS5A sobre la regulación de biomarcadores de activación de CEH en células LX2.** Las células Huh7 se transfectaron con pNluc-NS5A/HCV durante 24 horas y se co-cultivaron con LX2 durante 48 y 72 horas, luego se evaluó la expresión de biomarcadores de activación de CEH en células LX2. a) Cuantificación del número de copias del transcrito de ARNm de pNluc-NS5A/HCV por RT-qPCR y b) nivel de proteína de pNluc-NS5A/HCV determinado por la actividad nanoluc. c) Expresión relativa de ARNm de COL1A1, ACTA2, TGFβ1 y TIMP1 normalizada a GAPDH y ACTB evaluada por RT-qPCR. d) Niveles de proteína de Colágeno1, α-SMA, TGFβ1 y GAPDH mediante Western blot y análisis de densitometría. Los resultados gráficos se presentan como la media ± SEM de tres experimentos independientes. Prueba T, \*\*\*\*= $p < 0.0001$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*= $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$ .



**Figura 28. Efecto de *Core* sobre la regulación de biomarcadores de activación de CEH en células LX2.** Las células Huh7 se transfectaron con p*Core*/HCV durante 24 horas y se cocultivaron con LX2 durante 48 y 72 horas, luego se evaluó la expresión de biomarcadores de activación de CEH en células LX2. a) Cuantificación del número de copias del transcrito de ARNm de *Core*/HCV por RT-qPCR y b) nivel de proteína de *Core*/HCV determinado por el análisis densitométrico derivado de Western Blot c) Expresión relativa de ARNm de COL1A1, ACTA2, TGFβ1 y TIMP1 normalizada a GAPDH y ACTB evaluada por RT-qPCR. d) Niveles de proteína de Colágeno1, α-SMA, TGFβ1 y GAPDH mediante Western blot y análisis de densitometría. Los resultados gráficos se presentan como la media ± SEM de tres experimentos independientes. Prueba T, \*\*\*\*= $p < 0.0001$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*= $p < 0.01$  y \*= $p < 0.05$ .

Ya que algunos marcadores de activación se encontraron sobre expresados en aquellas células que expresaban las proteínas virales, se sugiere que estas proteínas juegan un rol importante en la activación de CEH, también se piensa que durante esta activación diversos procesos de fibrogénesis se puedan ver estimulados debido a la expresión de otros genes reguladores de fibrosis.

#### **7.6. Perfil de expresión génica asociado a procesos de fibrosis inducido por las proteínas NS5A y Core del VHC en células Huh7 durante el co-cultivo con células estelares hepáticas.**

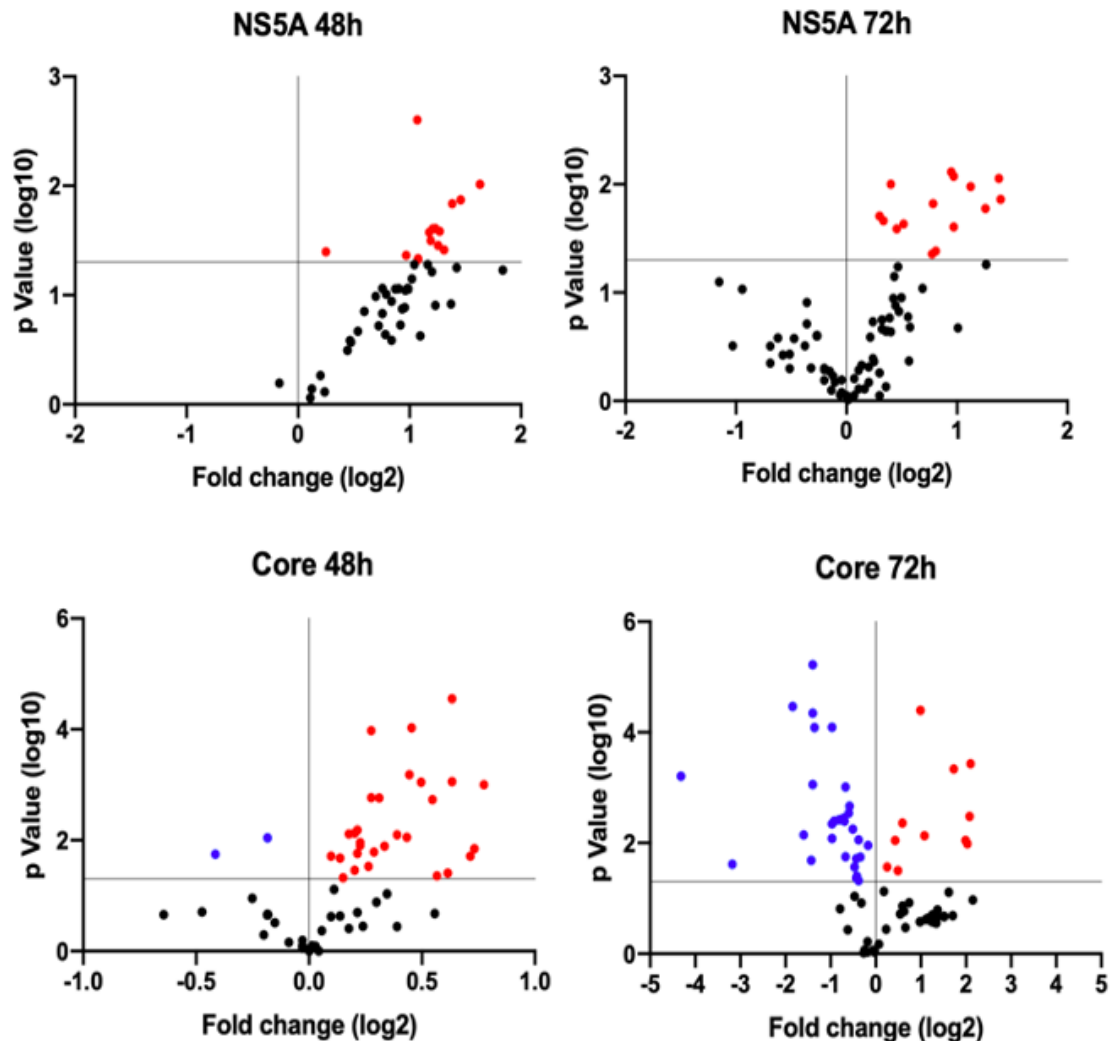
La comunicación intercelular entre hepatocitos y CEH durante la expresión de NS5A o Core puede regular diversas vías de señalización. Por lo tanto, analizamos el perfil de ARNm de 84 genes relacionados con fibrosis en células Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV después de 48 y 72 horas de co-cultivo con células LX2.

Se realizaron gráficas de volcán para observar la sub y sobreexpresión de los 84 genes asociados a fibrosis en cada uno de los casos, ya sea en presencia de NS5A o Core, y a las 48 o 72 horas de co-cultivo (**Figura 29**). Al comparar las gráficas, se observa que únicamente en el caso del co-cultivo durante 72 horas y en presencia de Core se lograron observar más de 10 genes subexpresados, lo que concuerda con la baja en la expresión de los marcadores de activación de las LX2 bajo las mismas condiciones.

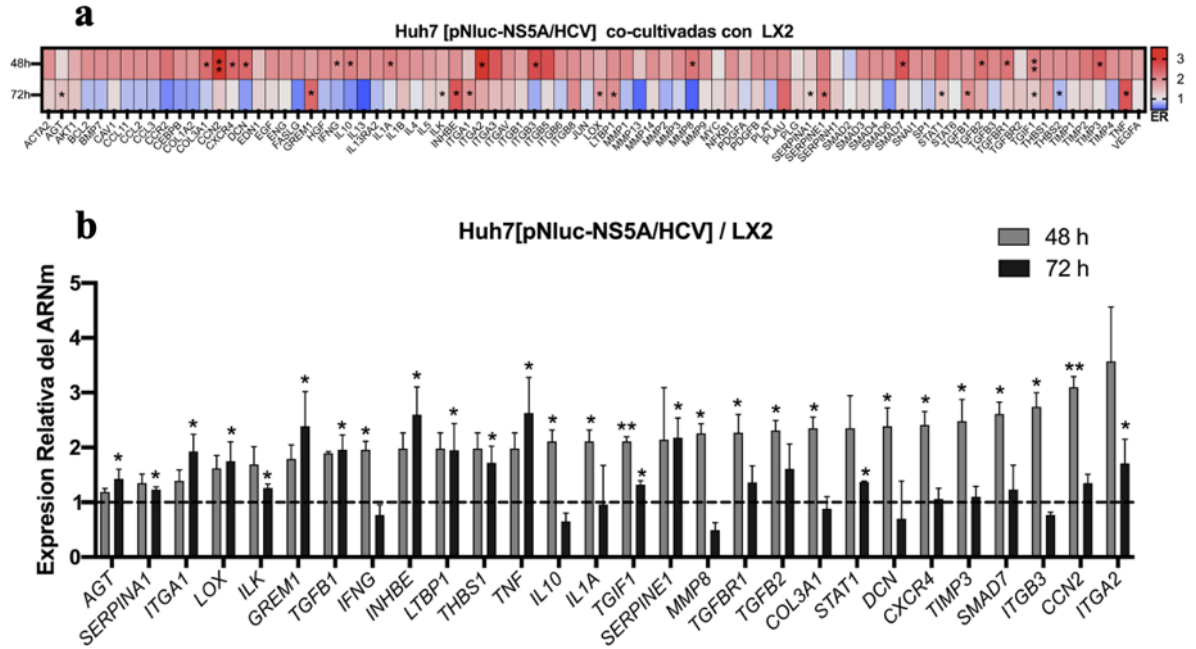
En la **Figura 30** se muestra un mapa de calor de la expresión relativa de cada uno de los genes, así como una gráfica con aquellos en donde se encontró una expresión diferencial de manera significativa al comparar la expresión de células Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV comparadas con el control, tanto a las 48 como a las 72 horas de co-cultivo con las células LX-2. De acuerdo con los resultados analizados, se encontró la sobreexpresión en 15 genes a las 48 horas de co-cultivo, incluyendo algunos miembros de la transducción de señales dentro de la superfamilia de TGF $\beta$  (DCN, SMAD7, TGFB2, TGFBR1 y TGIF1) y algunas moléculas de adhesión celular y de adhesión con la matriz extracelular (COL3A1, ITGB3, MMP8 y TIMP3). Además, se encontraron 15 genes sobreexpresados a las 72 horas de co-cultivo incluyendo también moléculas de adhesión

celular y de adhesión con la matriz extracelular (ITGA1, ITGA2, LOX, SERPINA1 y SERPINE1), así como otros miembros de la transducción de señales dentro de la superfamilia de TGF $\beta$  (GREM1, INHBE, LTBP1, TGFB1, TGIF1 y THBS1).

En la **Tabla 13** se enlistan cada uno de los genes diferencialmente expresados, el nivel de expresión relativa, y el nivel de significancia estadística determinados con el análisis.



**Figura 29.** Gráficos de volcán destacando los genes diferencialmente expresados en las células Huh7 después de 48 y 72 horas de co-cultivo con células LX2. a) GDE en presencia de NS5A y a las 48 y 72 horas de co-cultivo. b) GDE en presencia de Core a las 48 y 72 horas de co-cultivo. Los genes diferencialmente expresados con significancia estadística ( $p < 0.05$ ) se encuentran en la parte superior del eje horizontal. Los genes subexpresados se encuentran en el lazo izquierdo del eje vertical y los genes sobreexpresados del lado derecho de este mismo eje.



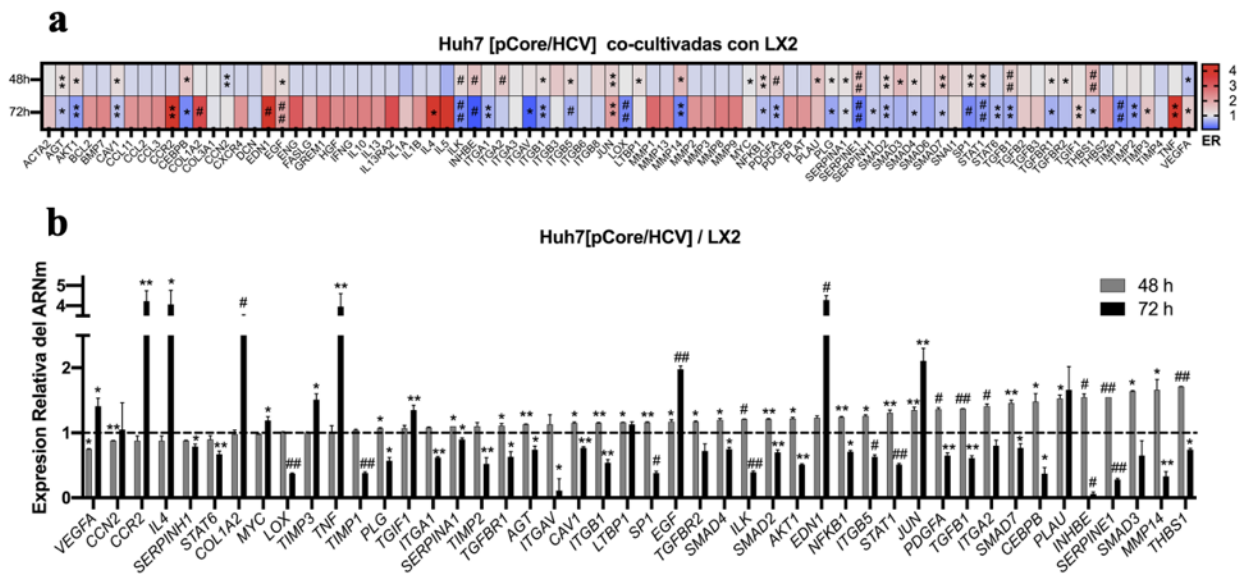
**Figura 30. Regulación de la expresión de genes relacionados con la fibrosis en Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y co-cultivadas con células LX2.** Las células Huh7 fueron transfectadas con pNluc-NS5A/VHC durante 24 horas y co-cultivadas con LX2 durante 48 y 72 horas, luego se evaluó la expresión de 84 genes relacionados con fibrosis en células Huh7. a) Mapa de calor de la expresión relativa de genes relacionados con la fibrosis evaluados por el *RT2 Profiler human fibrosis PCR Array*. b) Expresión relativa del ARNm de genes relacionados con la fibrosis expresados diferencialmente según análisis estadísticos. La línea punteada representa la expresión relativa del ARNm del grupo control. Los resultados gráficos se presentan como promedio SEM de tres experimentos independientes. Prueba de T, donde \*\*= $p < 0.01$  y \*= $p < 0.05$ .

Asimismo, en la **Figura 31**, se muestra un mapa de calor de la expresión relativa de cada uno de los genes, así como una gráfica con aquellos en donde se encontró una expresión diferencial de manera significativa al comparar la expresión de células Huh7 transfectadas con pCore/HCV comparadas con el control, tanto a las 48 como a las 72 horas de co-cultivo con las células LX-2. De acuerdo con el análisis estadístico, encontramos la sobreexpresión (en células Huh7 transfectadas con Core) de 29 genes incluyendo algunos miembros de la transducción de señales dentro de la superfamilia de TGF $\beta$  (CAV1, SMAD2, TGFB1, TGFBR1 y TGFBR2), algunas moléculas de transición epitelial-mesenquimal (AKT, ILK, SERPINE1, ITGB1) y dos genes subexpresados (CCN2 y VEGFA) todo esto, a las 48 horas de co-cultivo con LX2 y comparado con el control.

**Tabla 13. Genes asociados a fibrosis diferencialmente expresados en células NS5A Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y co-cultivadas con LX2.**

Refseq	Gen	Nombre	Expresión relativa	Valor de <i>p</i>
48 hours				
NM_001901	CCN2	Cellular communication network factor 2	3.10	0.010
NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3	2.74	0.013
NM_005904	SMAD7	SMAD family member 7	2.61	0.015
NM_000362	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	2.48	0.039
NM_003467	CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.41	0.026
NM_001920	DCN	Decorin	2.39	0.035
NM_000090	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	2.35	0.025
NM_003238	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	2.31	0.025
NM_004612	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1	2.27	0.032
NM_002424	MMP8	Matrix metalloproteinase 8	2.26	0.027
NM_000572	IL10	Interleukin 10	2.11	0.047
NM_000575	IL1A1	Interleukin 1, alpha	2.11	0.046
NM_003244	TGIF1	TGFB-induced factor homeobox 1	2.11	0.002
NM_000619	IFNG	Interferon, gamma	1.96	0.043
NM_000029	AGT	Angiotensinogen	1.19	0.040
72 hours				
NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor	2.63	0.014
NM_031479	INHBE	inhibin, beta E	2.60	0.009
NM_013372	GREM1	Gremlin 1	2.39	0.017
NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1	2.18	0.011
NM_000627	LTBP1	Latent TGFB binding protein 1	1.96	0.025
NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	1.96	0.008
NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1	1.93	0.008
NM_002317	LOX	Lysyl oxidase	1.75	0.041
NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1	1.72	0.015
NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2	1.71	0.044
NM_000029	AGT	Angiotensinogen	1.43	0.023
NM_007315	STAT1	Signal transducer activator of transcription 1	1.37	0.026
NM_003244	TGIF1	TGFB-induced factor homeobox 1	1.32	0.010
NM_004517	ILK	Integrin-linked kinase	1.26	0.022
NM_000295	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	1.23	0.020





**Figura 31. Regulación de la expresión de genes relacionados con la fibrosis en Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y co-cultivadas con células LX2.** Las células Huh7 fueron transfectadas con pNluc-NS5A/VHC durante 24 horas y co-cultivadas con LX2 durante 48 y 72 horas, luego se evaluó la expresión de 84 genes relacionados con fibrosis en células Huh7. a) Mapa de calor de la expresión relativa de genes relacionados con la fibrosis evaluados por el RT2 Profiler human fibrosis PCR Array. b) Expresión relativa del ARNm de genes relacionados con la fibrosis expresados diferencialmente según análisis estadísticos. La línea punteada representa la expresión relativa del ARNm del grupo control. Los resultados gráficos se presentan como promedio SEM de tres experimentos independientes. Prueba de T, donde ##=p <0.0001, #=p <0.001, \*\*=p <0.01, \*=p <0.05.

Además, encontramos 11 genes sobreexpresados como MYC, JUN, IL4 y CCR2, entre otros, a las 72 horas de co-cultivo. Además, se detectaron 29 genes subexpresados a las 72 horas de co-cultivo incluyendo diversas moléculas de adhesión celular y con la matriz extracelular (LOX, MMP14, PLG, SERPINE1, TIMP1, TIMP3, entre otros), y miembros de la transducción de señales dentro de la superfamilia de TGFβ (CAV1, INHBE, SMAD2, TGFBI, TGFBR1, entre otros). De igual manera, en la **Tabla 14** y **Tabla 15** se enlistan cada uno de los genes diferencialmente expresados, el nivel de expresión relativa, y el nivel de significancia estadística determinados con el análisis, cada una a las 48 y 72 horas de co-cultivo respectivamente.

**Tabla 14. Genes asociados a fibrosis diferencialmente expresados en células Core-Huh7 transfectadas con pCore/HCV y co-cultivadas con LX2 durante 48 horas.**

Refseq	Gen	Nombre	Expresión relativa	Valor de <i>p</i>
NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1	1.71	0.001
NM_004995	MMP14	Matrix metalloproteinase 14	1.66	0.014
NM_005902	SMAD3	SMAD family member 3	1.64	0.019
NM_031479	INHBE	Inhibin, beta E	1.55	0.001
NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E	1.55	0.001
NM_002658	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	1.53	0.039
NM_005194	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein beta	1.48	0.045
NM_005904	SMAD7	SMAD family member 7	1.46	0.002
NM_002203	ITGA2	Integrin, alpha 2	1.41	0.001
NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	1.37	0.001
NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	1.36	0.001
NM_002228	JUN	Jun proto-oncogene	1.35	0.009
NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription	1.31	0.008
NM_002213	ITGB5	Integrin, beta 5	1.26	0.013
NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells	1.24	0.002
NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene	1.22	0.016
NM_004517	ILK	Integrin-linked kinase	1.21	0.001
NM_005901	SMAD2	SMAD family member 2	1.21	0.002
NM_005359	SMAD4	SMAD family member 4	1.20	0.030
NM_001963	EGF	Epidermal growth factor	1.17	0.012
NM_000627	LTBP1	Latent TGFB binding protein	1.16	0.017
NM_128473	SP1	Sp1 transcription factor	1.16	0.007
NM_001753	CAV1	Caveolin 1	1.15	0.035
NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1	1.15	0.007
NM_000029	AGT	Angiotensinogen	1.13	0.008
NM_004612	TGFBR1	TGFB receptor 1	1.11	0.047
NM_000295	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A	1.10	0.021
NM_000301	PLG	Plasminogen	1.07	0.019
NM_003242	TGFBR2	TGFB receptor 2	1.07	0.011
NM_001901	CCN2	Cellular communication network factor 2	0.88	0.009
NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	0.75	0.018

**Tabla 15. Genes asociados a fibrosis diferencialmente expresados en células Core-Huh7 transfectadas con pCore-NS5A/HCV y co-cultivadas con LX2 durante 72 horas.**

Refseq	Gen	Nombre	Expresión relativa	Valor de <i>p</i>
NM_001955	EDN1	Endothelin1	4.28	0.001
NM_001123	CCR2	Chemokine	4.23	0.003
NM_000589	IL-4	Interleukin 4	4.07	0.010
NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor	3.96	0.009
NM_000089	COL1A2	Collagen, type 1, alpha 2	3.32	0.001
NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha	2.20	0.003
NM_002228	JUN	Jun proto-oncogene	2.11	0.007
NM_001963	EGF	Epidermal growth factor	1.98	0.001
NM_000362	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	1.51	0.004
NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	1.40	0.032
NM_003244	TGIF1	TGFB-induced factor homeobox 1	1.35	0.009
NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene	1.19	0.027
NM_000295	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A, 1	0.89	0.011
NM_001235	SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H, 1	0.79	0.018
NM_001753	CAV1	Caveolin 1	0.77	0.009
NM_005904	SMAD7	SMAD family member 7	0.77	0.048
NM_005359	SMAD4	SMAD family member 4	0.75	0.039
NM_000029	AGT	Angiotensinogen	0.74	0.043
NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1	0.74	0.019
NM_003998	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	0.72	0.027
NM_005901	SMAD2	SMAD family member 2	0.70	0.006
NM_003153	STAT6	Signal transducer activator of transcription 6	0.67	0.002
NM_02213	ITGB5	Integrin, beta 5	0.63	0.001
NM_004612	TGFBR1	TGFB receptor 1	0.63	0.018
NM_181501	ITGA1	Integrin, alpha 1	0.62	0.004
NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	0.61	0.004
NM_000301	PLG	Plasminogen	0.57	0.004
NM_002211	ITGB1	Integrin, beta 1	0.53	0.004
NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene	0.51	0.004
NM_007315	STAT1	Signal transducer activator of transcription 1	0.51	0.001
NM_003255	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	0.51	0.008
NM_004517	ILK	Integrin-linked kinase	0.39	0.001
NM_002317	LOX	Lysyl oxidase	0.38	0.001

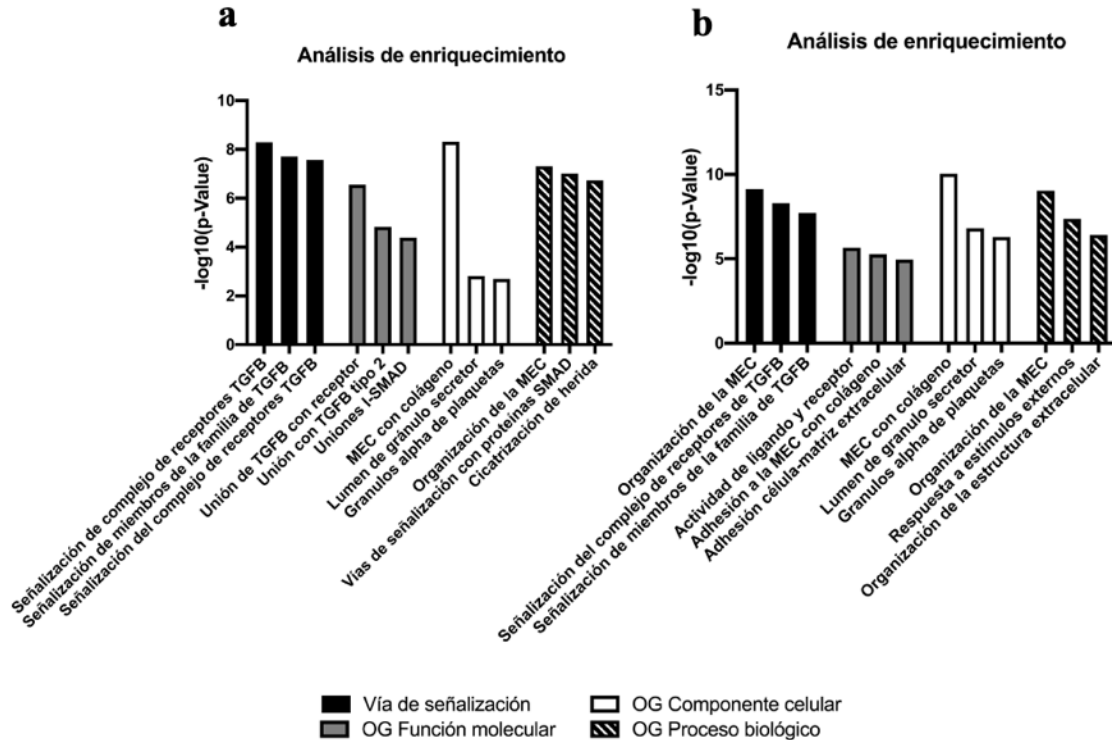
NM_138473	SP1	Sp1 transcription factor	0.38	0.001
NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	0.38	0.001
NM_005194	CEBPC	CCAAT/enhancer binding protein	0.37	0.021
NM_0004995	MMP14	Matrix metalloproteinase 14	0.33	0.007
NM_000602	SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E, 1	0.28	0.001
NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V	0.11	0.024
NM_031479	INHBE	inhibin, beta E	0.05	0.001

*Continuación de tabla 14.*

### **7.7. Enriquecimiento de vías moleculares y ontología de genes inducido por las proteínas NS5A y Core del VHC en células Huh7 durante el co-cultivo con células estelares hepáticas LX2.**

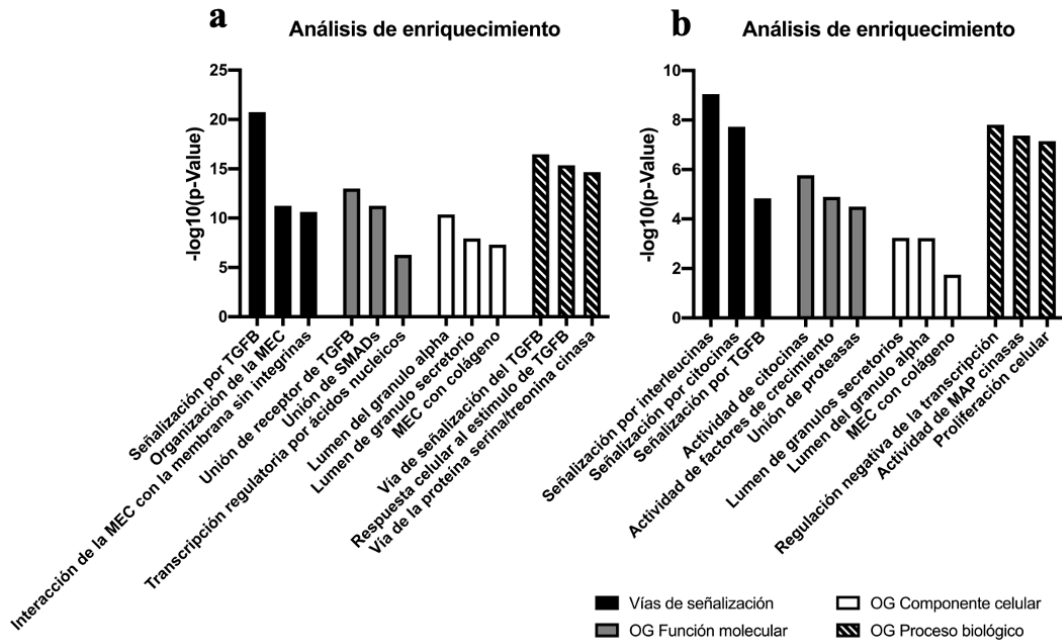
Los genes diferencialmente expresados (GDE) con significancia estadística obtenidos en el arreglo de qPCR fueron analizados por la plataforma *Enrichr* en [maayanlab.cloud/Enrichr/](http://maayanlab.cloud/Enrichr/). El análisis de vías de señalización significativamente enriquecidas revela que las células Huh7 transfectadas con pNluc-NS5A/HCV están más asociadas con el complejo de receptores del TGF $\beta$  y las vías de organización de la matriz extracelular a las 48 y 72 h de co-cultivo con LX2, respectivamente. Además, el análisis de ontología de genes (OG) reveló la unión del TGF $\beta$  con su receptor y la actividad del ligando-receptor como un enriquecimiento de la función molecular a las 48 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. La matriz extracelular que contiene colágeno y la organización de la matriz extracelular fueron, el componente celular y el proceso biológico más enriquecidos, respectivamente tanto a las 48 como a las 72 horas de co-cultivo (**Figura 32**). Por otro lado, respecto a las células Huh7 transfectadas con pCore/HCV se reveló que se ven más enriquecidas las vías de señalización por receptores de TGF $\beta$  y la vía de señalización derivadas de interleucinas, a las 48 y 72 h de co-cultivo, respectivamente. Además, el análisis de OG revela que la unión del TGF $\beta$  con su receptor y la actividad de citocinas como más enriquecidas de acuerdo con la función molecular, a las 48 y 72 h de co-cultivo respectivamente. El lumen de gránulos fue el componente celular más enriquecido tanto a las 48 como a las 72 horas de co-cultivo. La vía de señalización por el

receptor del TGF $\beta$  y la regulación negativa de la transcripción fueron el proceso biológico más enriquecido a las 48 y 72 horas de co-cultivo respectivamente (**Figura 33**).

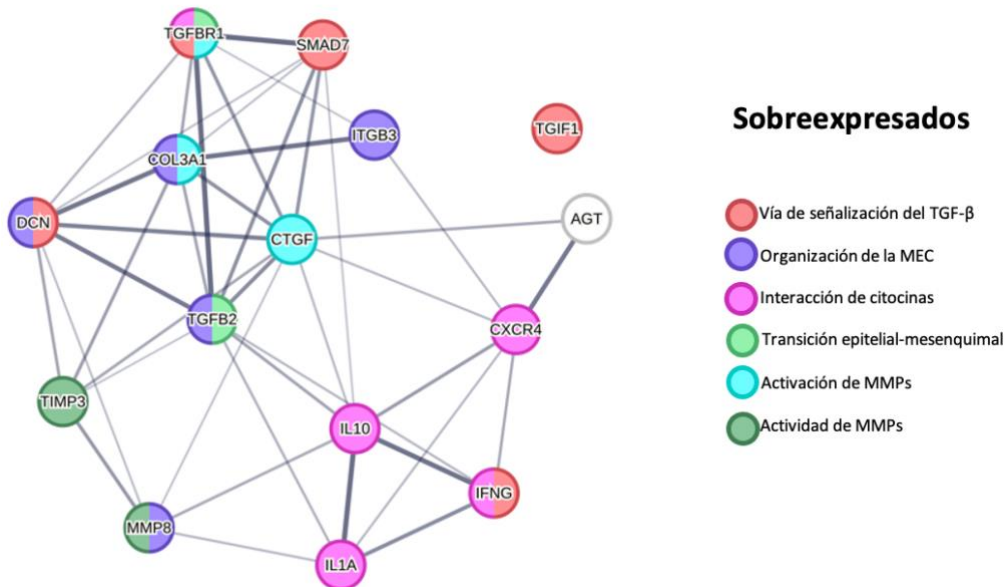


**Figura 32. Análisis de enriquecimiento de GDE inducidos por la expresión de NS5A/HCV en Huh7 co-cultivadas con células LX2.** Los genes relacionados con la fibrosis evaluados por arreglo de qPCR se analizaron con la plataforma *Enrichr* a) Enriquecimiento de la vía de señalización y análisis de Ontología Génica (OG) de los GDE a las 48 horas. b) Enriquecimiento de la vía de señalización y análisis de Ontología Génica de los genes DEGs a las 72 horas.

Además, se realizó un análisis en la base de datos STRING ([string-db.org](http://string-db.org)) para identificar relaciones y redes de interacciones proteína-proteína entre los GDE. En el caso de las células transfectadas con pNluc-NS5A/HCV, se obtuvieron diferentes clústeres en función de la vía molecular en la que participa cada proteína y su respectiva interacción, así como la reticulación con otras vías de señalización, entre las más favorecidas fueron la vía de señalización del TGF $\beta$ , organización de la matriz extracelular y la vía del inhibidor de la endopeptidasa serina, entre otros (**Figura 34** y **Figura 35**).



**Figura 33. Análisis de enriquecimiento de GDE inducidos por la expresión de Core/HCV en Huh7 co-cultivadas con células LX2.** Los genes relacionados con la fibrosis evaluados por arreglo de qPCR se analizaron con la plataforma *Enrichr* a) Enriquecimiento de la vía de señalización y análisis de Ontología Génica (OG) de los GDE a las 48 horas. b) Enriquecimiento de la vía de señalización y análisis de Ontología Génica de los genes DEGs a las 72 horas.



**Figura 34. Análisis de las redes de interacción proteína-proteína de los GDE inducidos por la expresión de NS5A/HCV en Huh7 co-cultivado con células LX2 durante 48 horas.**

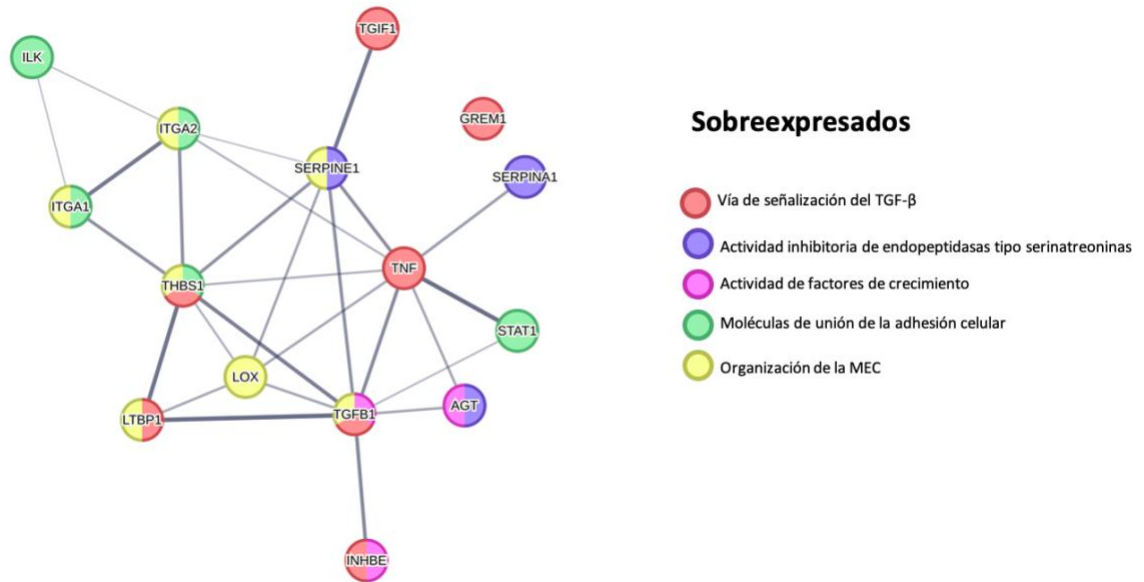


Figura 35. Análisis de las redes de interacción proteína-proteína de los GDE inducidos por la expresión de NS5A/HCV en Huh7 co-cultivado con células LX2 durante 72 horas.

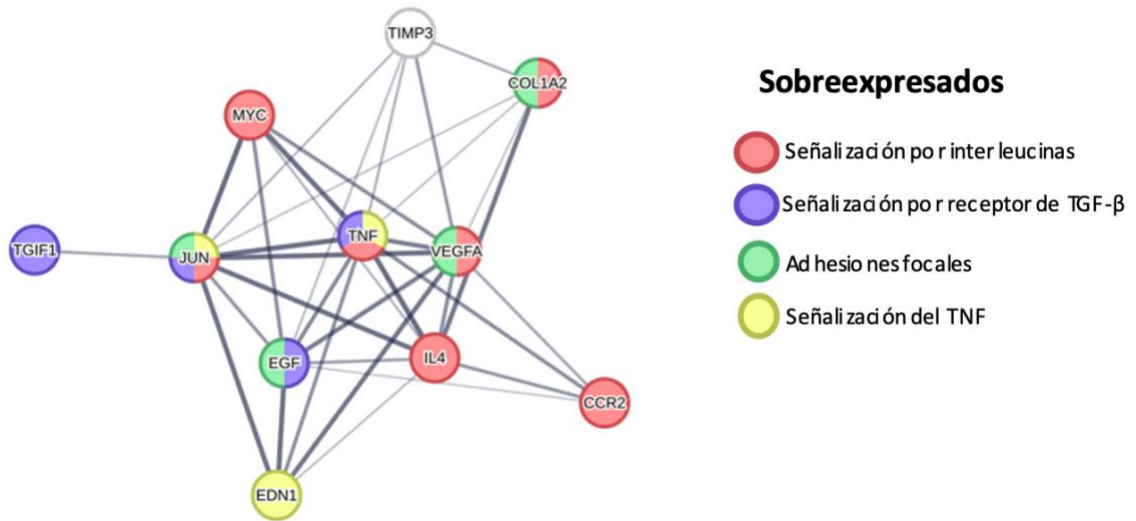
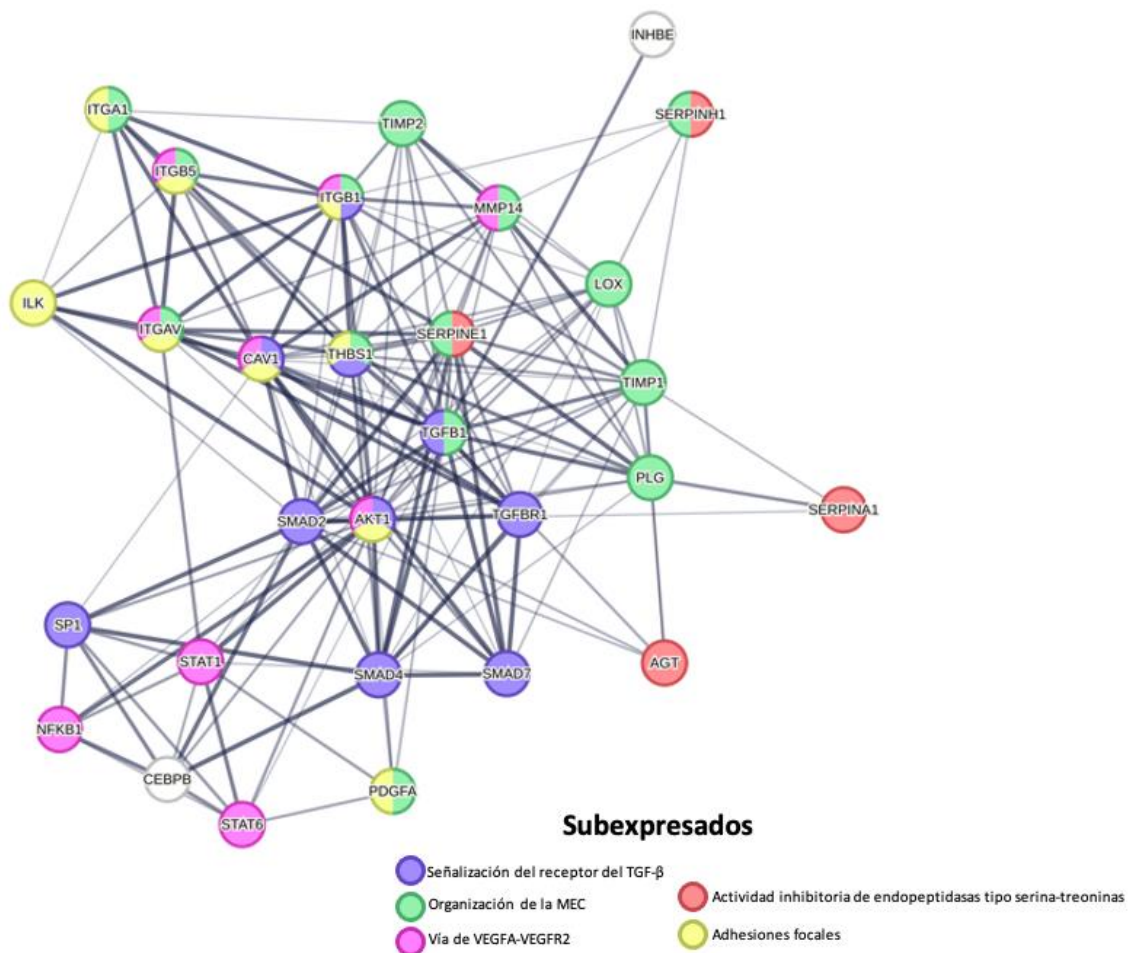


Figura 36. Análisis de las redes de interacción proteína-proteína de los GDE inducidos por la expresión de Core/HCV en Huh7 co-cultivado con células LX2 durante 48 horas.





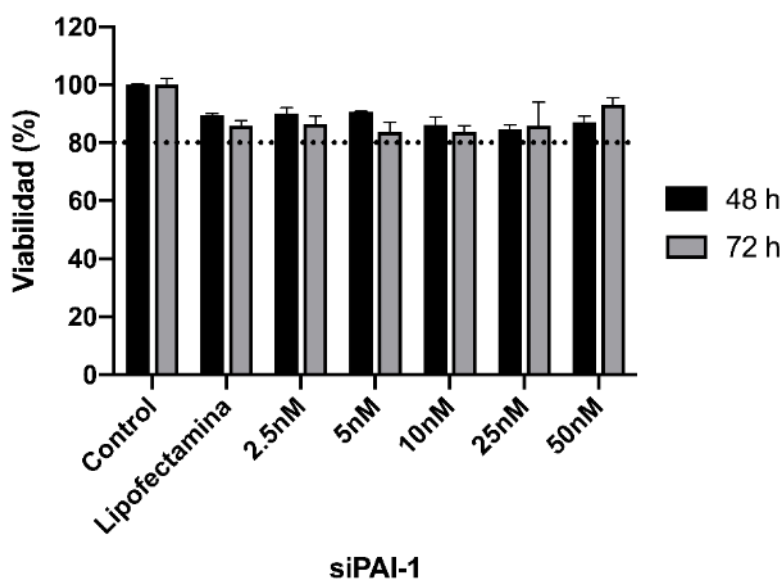
**Figura 37.** Análisis de las redes de interacción proteína-proteína de los GDE inducidos por la expresión de Core/HCV en Huh7 co-cultivado con células LX2 durante 72 horas.

Por otro lado, el análisis con la plataforma STRING de los GDE derivados de las células transfectadas con pCore/HCV y co-cultivadas con LX2 demostró que a las 48 horas de co-cultivo se enriqueció la vía de señalización del receptor TGF $\beta$ , mientras que a las 72 horas esta vía molecular se asoció con genes subexpresados, es decir, se encontraba desregulada. Por otro lado, la señalización por interleucinas fue enriquecida por los genes sobreexpresados a las 72 horas de co-cultivo (**Figura 36** y **Figura 37**).



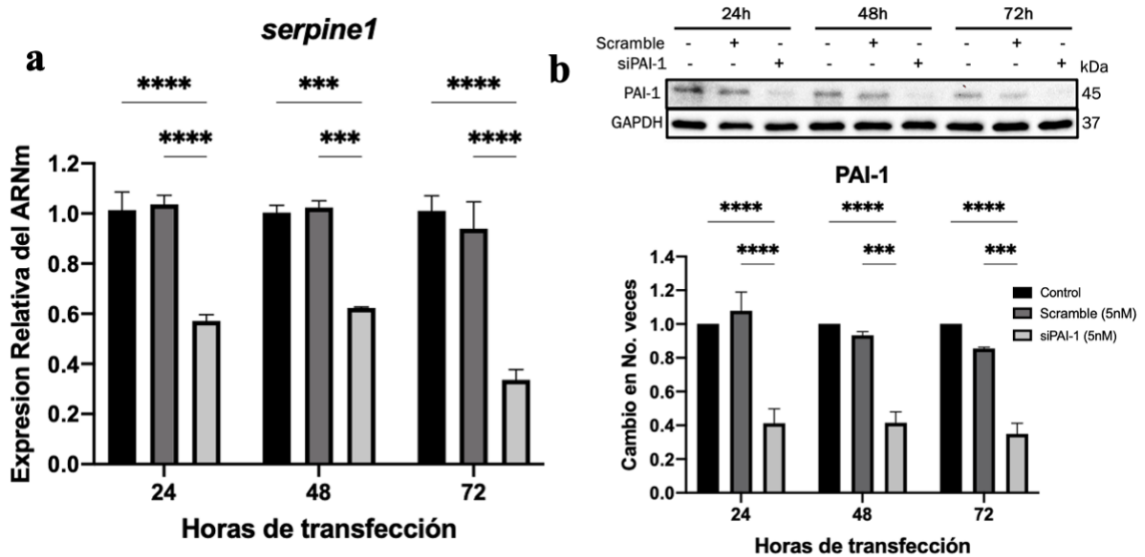
### 7.8. Participación del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) en la TEM durante la expresión de las proteínas NS5A y Core del VHC en células Huh7.

De acuerdo con los análisis derivados del arreglo de qPCR, unas de las principales vías asociadas, además de la señalización del TGF $\beta$ , es la actividad inhibitoria de las tipo serin proteasas. Además, el gen *serpine1* (gen codificante para el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 [PAI-1]) fue de los genes con mayor expresión diferencial durante los ensayos de co-cultivo. Se decidió inhibir la expresión y la acción de PAI-1, ya que es uno de los miembros de la familia de los inhibidores de las tipo serin proteasas, y podría tener una participación importante durante la transición epitelial mesenquimal de las Huh7. Para obtener una concentración no citotóxica del siRNA para silenciar a PAI-1 (siPAI-1) con la que se pudiera trabajar en la línea celular Huh7, se realizaron ensayos de viabilidad tomando en cuenta distintas concentraciones del siPAI-1 a diferentes tiempos de transfección (**Figura 38**).



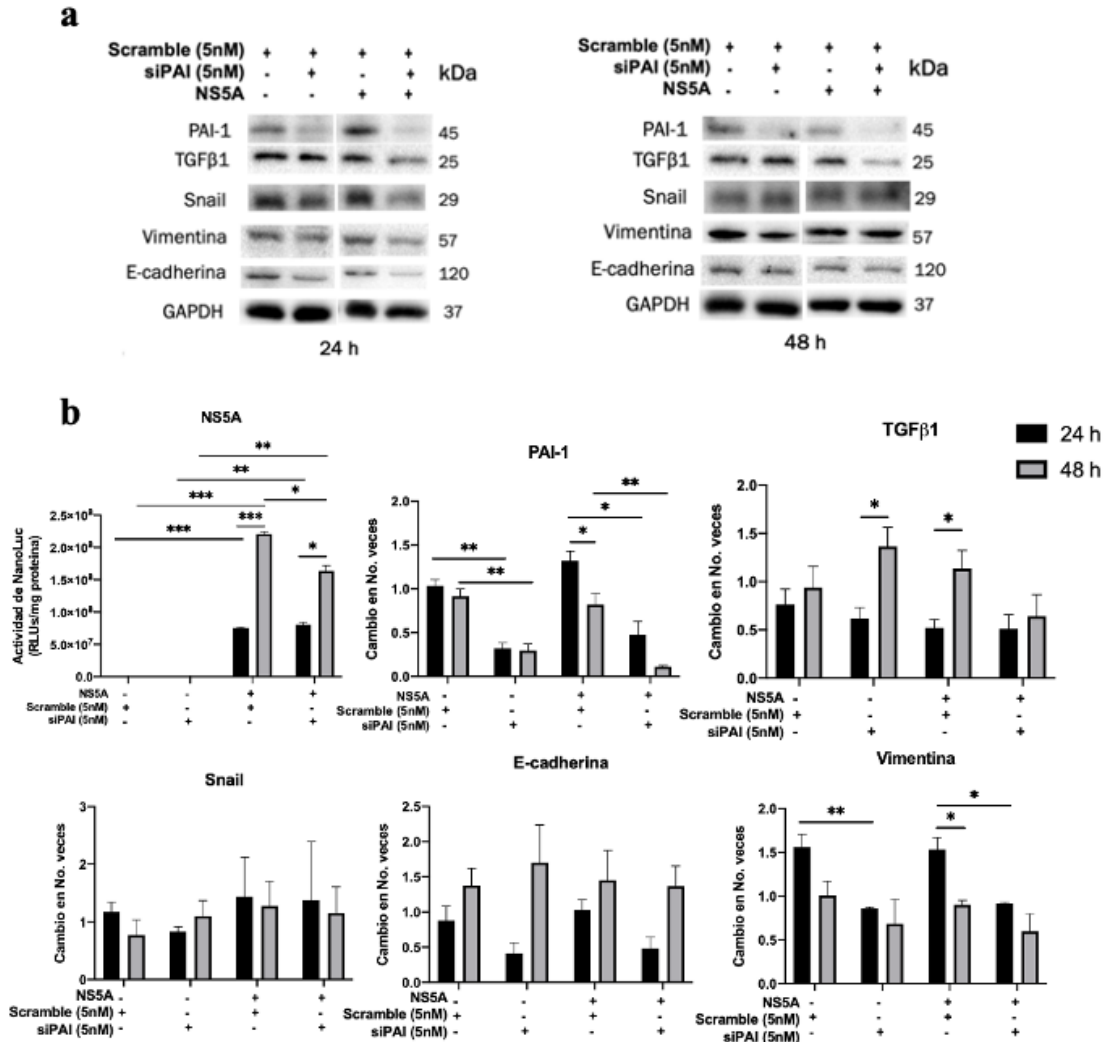
**Figura 38. Efecto del siPAI-1 sobre la viabilidad de células Huh7 a las 48 y 72 horas de transfección.** Se transfectaron las células Huh7 con distintas concentraciones de siPAI-1 y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo de MTT a las 48 y 72 horas de tratamiento. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Debido a que se presentaba más del 80% de células viables con todas las concentraciones, se decidió trabajar con la concentración de 5nM, ya que es la concentración que se recomienda por el proveedor y la cual cuenta con validación de silenciamiento. Para validar el silenciamiento de PAI-1, se realizó una transfección en las células Huh7 con 5nM del siPAI-1, después de 24, 48 y 72 horas se evaluó la expresión a nivel transcripcional y traduccional de PAI-1 mostrándose una disminución del 60% que permaneció hasta las 72 horas de transfección (**Figura 39**).



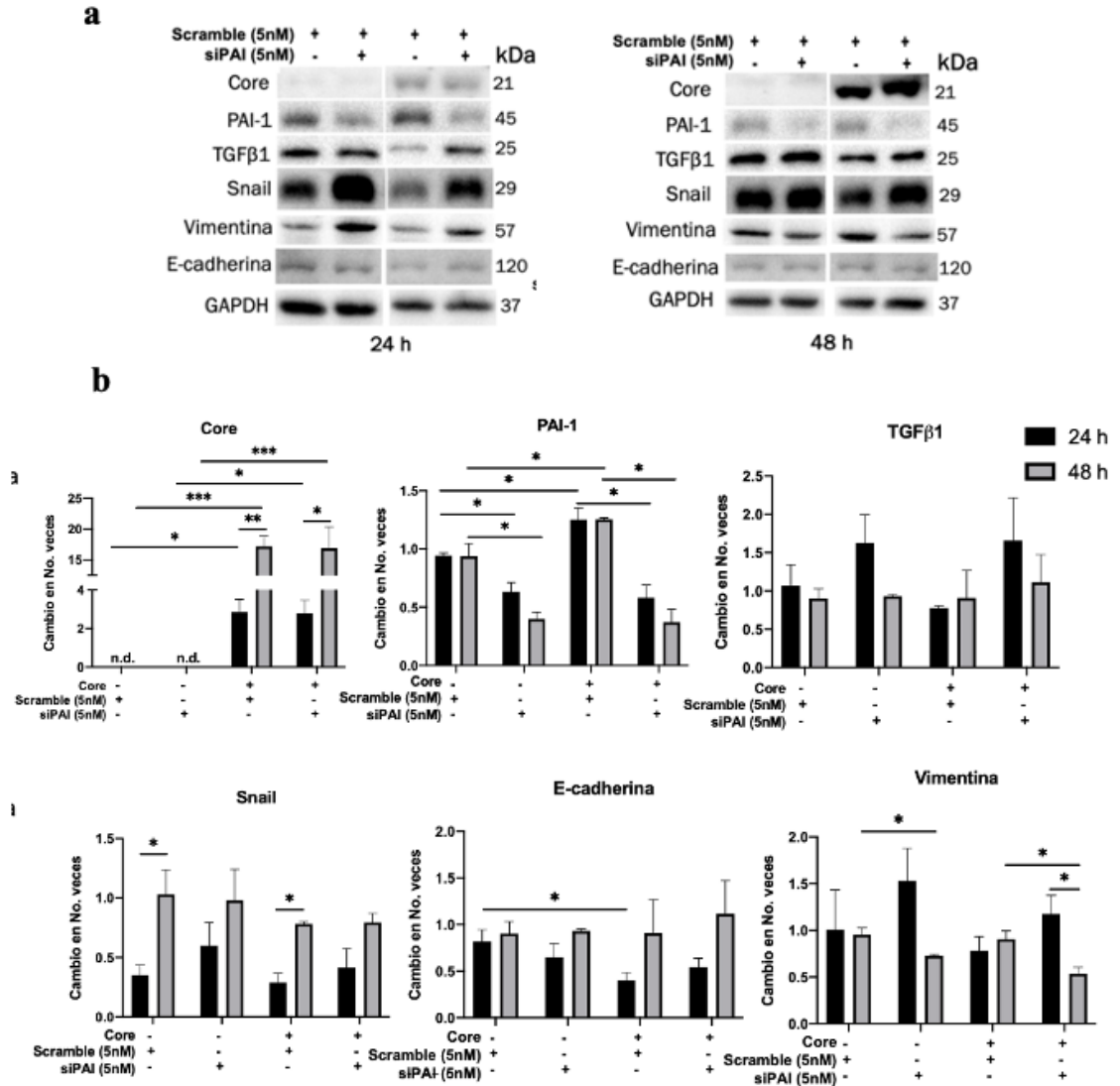
**Figura 39. Expresión de PAI-1 en células Huh7 a las 24, 48 y 72 horas de silenciamiento.** a) Expresión relativa de ARNm de *serpine1* normalizada con *gapdh* evaluada por RT-qPCR. b) Expresión de proteína PAI-1 y GAPDH mediante Western blot y análisis densitométrico. Los resultados gráficos se presentan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. ANOVA de dos vías, donde \*\*\*\* =  $p < 0.0001$  y \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Se transfectaron células con pNluc-NS5A/HCV y después de 24 horas, fueron transfectadas con el siPAI-1 (5nM) durante 24 y 48 horas para evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de PAI-1 en la TEM inducida por la proteína NS5A del VHC.



**Figura 40. Expresión de biomarcadores de la TEM en células Huh7-NS5A a las 24 y 48 horas de transfección con siPAI-1.** a) Nivel de proteína de NS5A, PAI-1, y marcadores de la TEM normalizado con GAPDH y evaluado mediante western blot. b) Nivel de proteína relativa en las Huh7-NS5A evaluada mediante análisis densitométrico del western blot normalizado con el grupo control. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. ANOVA de dos vías, donde \*= $p \leq 0.05$ , \*\*= $p \leq 0.01$  y \*\*\*= $p \leq 0.001$

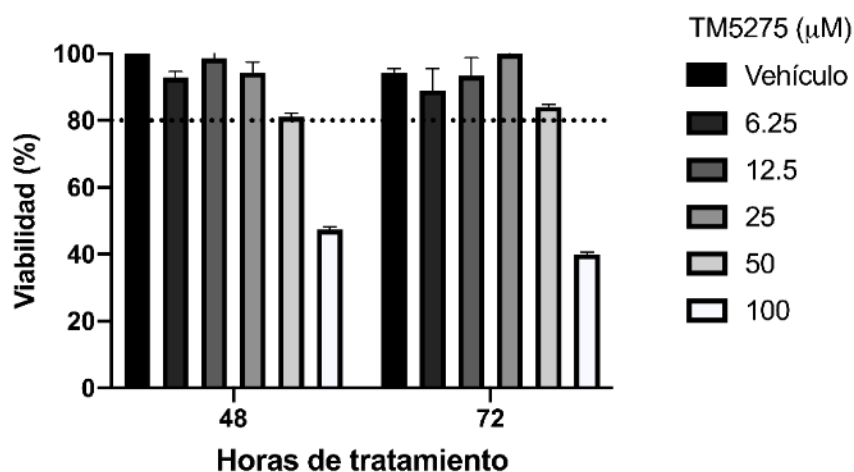
Asimismo, se transfectaron células con pCore/HCV por 24 horas y posteriormente fueron transfectadas con el siPAI-1 (5nM) durante 24 y 48 horas para evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de PAI-1 en la TEM inducida por la proteína Core del VHC.



**Figura 41. Expresión de biomarcadores de la TEM en células Huh7-Core a las 24 y 48 horas de transfección con siPAI-1.** a) Nivel de proteína de Core, PAI-1, y marcadores de la TEM normalizado con GAPDH y evaluado mediante western blot. b) Nivel de proteína relativa en las Huh7-Core evaluada mediante análisis densitométrico del western blot normalizado con el grupo control. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. ANOVA de dos vías, donde  $*=p\leq 0.05$ ,  $**=p\leq 0.01$  y  $***=p\leq 0.001$

El silenciamiento de PAI-1 no provocó cambios en la expresión de las proteínas NS5A y Core del VHC. Por otro lado, al disminuir la expresión de PAI-1 también se observó una disminución de vimentina del 50% comparándolo con el control (scramble) aún en presencia de las proteínas NS5A y Core. Por otro lado, solo en presencia de Core, el

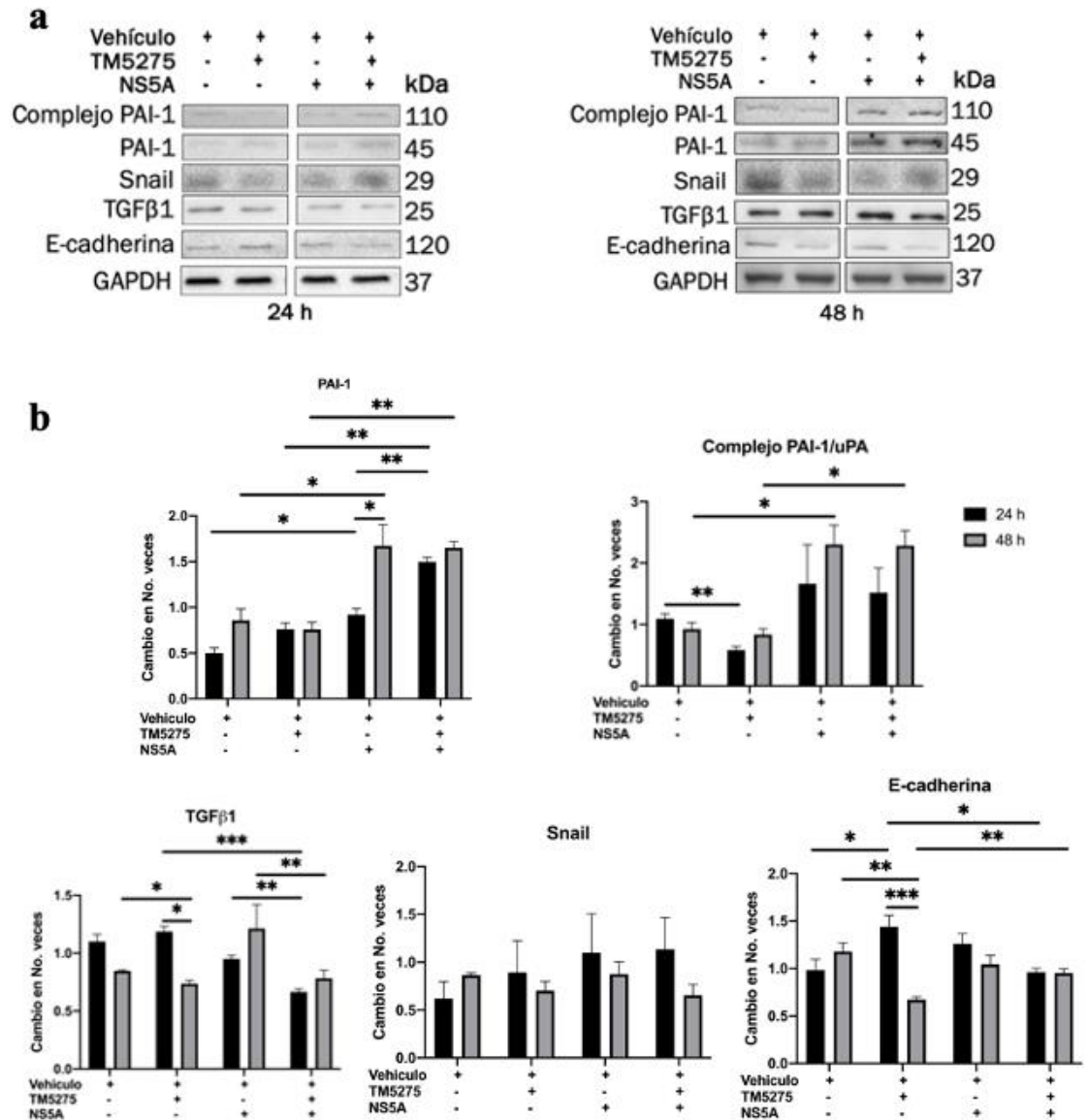
silenciamiento de PAI-1 logró evitar la disminución de la E-cadherina que se observaba normalmente comparado con el control sin transfectar con pCore/HCV. Asimismo, el silenciamiento de PAI-1 evitó el aumento del 70% de Snail a través del tiempo que se observa en el grupo control (scramble) y en el grupo transfectado con pCore/HCV. El inhibidor químico TM5275 bloquea la formación del complejo de PAI-1/uPA necesarios para desencadenar la vía molecular efectora, por lo tanto, fue utilizado para tratar las células transfectadas con pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV con el fin de evaluar el efecto que tiene el bloqueo de esta vía sobre la transición epitelial mesenquimal inducida por las proteínas NS5A y Core del VHC. Para obtener una concentración no citotóxica con la que se pudiera trabajar en la línea celular Huh7, se realizaron ensayos de viabilidad tomando en cuenta la concentración necesaria del vehículo (DMSO) como control, así como diferentes concentraciones del TM5275 (**Figura 42**).



**Figura 42. Efecto del TM5275 sobre la viabilidad de células Huh7 a las 48 y 72 horas de tratamiento.** Se trataron las células Huh7 con distintas concentraciones de TM5275 y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo de MTT a las 48 y 72 horas de tratamiento. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Debido a que desde las 48 horas de tratamiento con 50 y 100  $\mu$ M del TM5275 se presentaba menos del 80% de células viables, se decidió trabajar con la concentración de 25  $\mu$ M para ensayos posteriores. Se transfectaron células con pNluc-NS5A/HCV y fueron

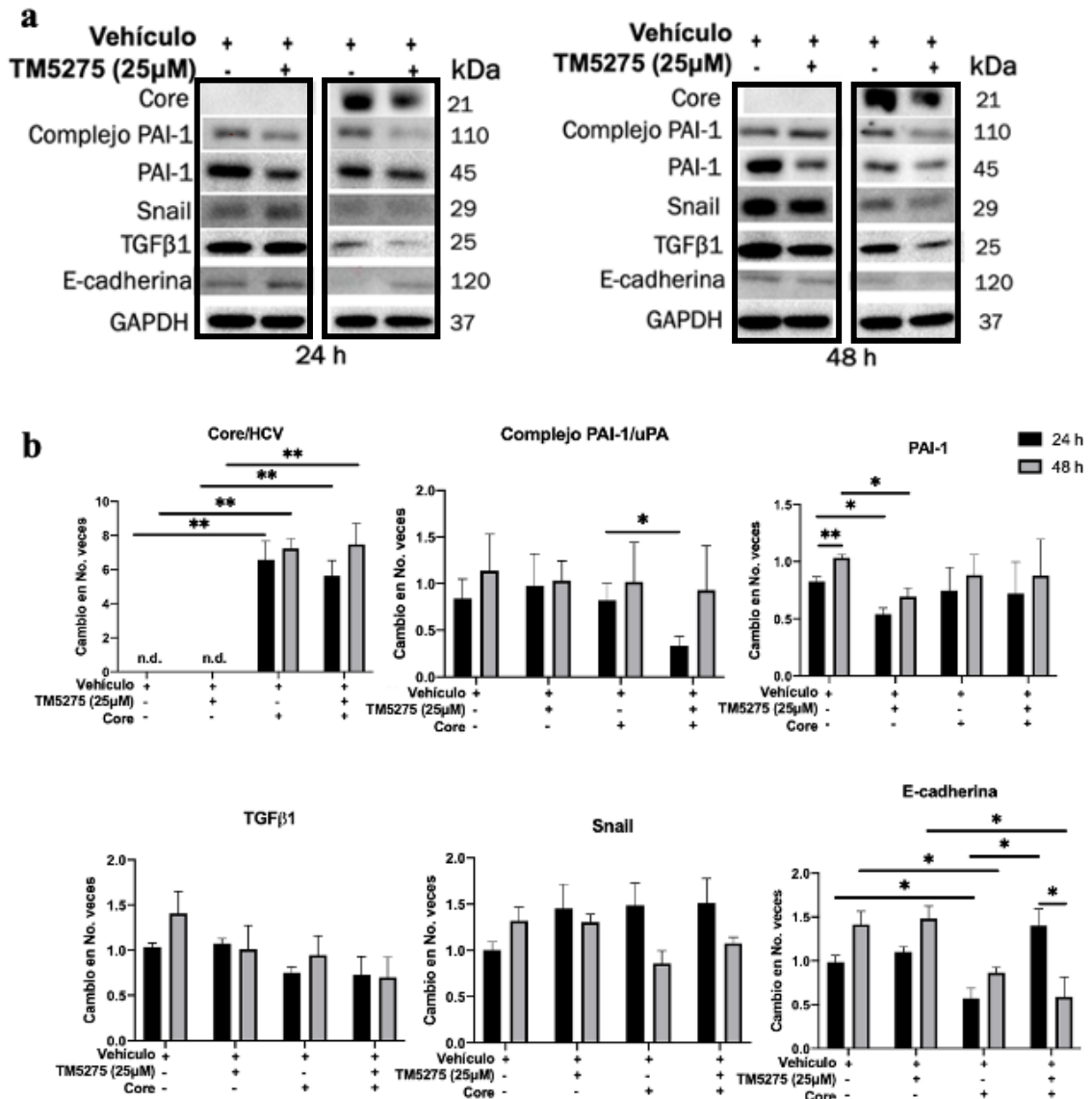
tratadas con TM5275 durante 24 y 48 horas para evaluar el efecto de la inhibición del complejo PAI-1/uPA en la TEM inducida por la proteína NS5A del VHC.



**Figura 43. Expresión de biomarcadores de la TEM en células Huh7-NS5A a las 24 y 48 horas de tratamiento con TM5275.** a) Nivel de proteína PAI-1, Complejo de PAI-1/uPA y marcadores de la TEM normalizado con GAPDH y evaluado mediante western blot. b) Nivel de proteína relativa en las Huh7-NS5A evaluada mediante análisis densitométrico del western blot normalizado con el grupo control. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. ANOVA de dos vías, donde  $*=p\leq 0.05$ ,  $**=p\leq 0.01$  y  $***=p\leq 0.001$

El nivel de proteína de PAI-1 fue estadísticamente mayor en células transfectadas con pNluc-NS5/HCV en comparación con el grupo control tratado únicamente con el vehículo, asimismo, al ser transfectadas y tratadas con TM5275 fue aún mayor comparado con el control tratado con TM5275 e incluso mayor al compararlo únicamente con el grupo solo con pNluc-NS5A/HCV. Por otro lado, el TM5275 fue capaz de disminuir el nivel de proteína del complejo PAI-1/uPA únicamente en grupo control a las 24 horas de tratamiento. Por otro lado, pNluc-NS5A/HCV induce el aumento de este complejo, aun con el TM5275, comparado con su respectivo control. Contrario a lo que se esperaba, el TM5275 fue capaz de disminuir aún más, los niveles de TGFβ1 en células transfectadas a las 24 y 48 horas de tratamiento, mientras que en el grupo control solo disminuyó a las 48 horas de tratamiento. Por otro lado, TM5275 estimuló los niveles de E-cadherina a las 24 horas de tratamiento, pero causó la disminución a las 48 horas de tratamiento en el grupo control, mientras que en células transfectadas con pNluc-NS5A/HCV, el TM5275 no tuvo ningún efecto sobre los niveles de la E-cadherina. Adicionalmente, el TM5275 no tuvo efecto en los niveles de Snail en ninguno de los grupos evaluados (**Figura 43**).

Asimismo, se transfectaron células con pCore/HCV y fueron tratadas con TM5275 durante 24 y 48 horas para evaluar el efecto de la inhibición del complejo PAI-1/uPA en la TEM inducida por la proteína Core del VHC. El nivel de proteína de PAI-1 fue estadísticamente menor solo en el grupo control después de las 24 y 48 horas de tratamiento con el TM5275. Por otro lado, el TM5275 fue capaz de disminuir el nivel de proteína del complejo PAI-1/uPA únicamente en el grupo transfectado con pCore/HCV y solo después de 24 horas del tratamiento. Además, el TM5275 fue capaz de revertir el efecto que tiene la transfección de pCore-HCV de bajar los niveles de proteína de la E-cadherina, logrando igualar los niveles de E-cadherina con el grupo control, sin embargo, este efecto del TM5275 solo fue visible a las 24 horas de tratamiento, ya que a las 48 de tratamiento los niveles de E-cadherina volvieron a bajar, posiblemente debido a la presencia de Core del VHC (**Figura 44**).



**Figura 44. Expresión de biomarcadores de la TEM en células Huh7-Core a las 24 y 48 horas de tratamiento con TM5275.** a) Nivel de proteína PAI-1, Complejo de PAI-1/uPA y marcadores de la TEM normalizado con GAPDH y evaluado mediante western blot. b) Nivel de proteína relativa en las Huh7-Core evaluada mediante análisis densitométrico del western blot normalizado con el grupo control. Los resultados graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. ANOVA de dos vías, donde \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  y \*\*\* $p \leq 0.001$



## 8. DISCUSIÓN

La infección crónica por el virus de la hepatitis C induce daño hepático que puede llegar a ocasionar el desarrollo de fibrosis hepática, la cual puede ser reversible cuando se resuelve la etiología de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de la implementación de antivirales de acción directa para resolver la infección por el VHC, en ciertos casos, el desarrollo de la fibrosis continúa ocurriendo y desafortunadamente aún no se ha aprobado ningún medicamento para el tratamiento de la fibrosis hepática (Böttcher and Pinzani, 2017). Por lo tanto, comprender los mecanismos moleculares desencadenados por la infección con VHC que inducen fibrosis, contribuye a identificar dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos anti-fibróticos. Siendo la transición TEM de hepatocitos y la activación de CEH algunos de los procesos que promueven el desarrollo de la fibrosis, en este estudio se determinó el papel de la proteína NS5A y Core del VHC en la regulación de la TEM de Huh7 y, en la activación de las CEH LX2 en co-cultivo con las células Huh7 transfectadas. Asimismo, se analizó el efecto de este co-cultivo en la regulación transcripcional de diversos genes relacionados con procesos fibróticos, lo que nos permitió seleccionar una proteína como blanco para inhibir y ver sus efectos en la regulación de la TEM y activación de LX2 inducidas por las proteínas virales.

De acuerdo con nuestros resultados, se determinó que la transfección de células Huh7 con pNluc-NS5A/HCV induce un aumento significativo en el nivel de proteína TGF $\beta$ 1, un aumento en Snail y una disminución de E-cadherina, aunque a nivel transcripcional no se obtuvieron diferencias significativas. Esto sugiere una posible regulación post-transcripcional. Por otro lado, se determinó que la transfección con pCore/HCV induce a un aumento transcripcional y en nivel de proteína de Snail y un nivel bajo de la proteína E-cadherina. Asimismo, con el ensayo de cicatrización de herida corroboramos que tanto pNluc-NS5A/HCV como pCore/HCV (aunque no de manera significativa) confirieron a las células una mayor capacidad de migración e invasión. Estos resultados nos sugieren que la proteína NS5A y Core pueden estar participando en la regulación de la expresión

de marcadores de la TEM. De la misma manera, ya se ha demostrado que distintas proteínas del VHC regulan la TEM a través de distintas vías moleculares (Arora et al., 2008; Hu et al., 2017; Zhou et al., 2017). Sin embargo, consideramos que la TEM en células Huh7 inducida por NS5A no está mediada por la vía Snail, ya que no se observaron cambios en la expresión de Snail con la presencia de NS5A. Además, otros estudios sugieren que la participación de la NS5A del VHC en la TEM está mediada por la vía molecular de Twist (Akkari et al., 2012). Por lo tanto, es importante considerar que la promoción de la TEM puede estar regulando por la participación de dichas proteínas virales por separado, y que cada una de ellas juega un papel importante.

Por otro lado, se evaluó la activación de células estelares hepáticas humanas LX2 inducida por las proteínas NS5A y Core del VHC. Determinamos que pNluc-NS5A/HCV y pCore/HCV inducen la activación de LX2 debido al aumento de expresión del Colageno1,  $\alpha$ -SMA, TGF $\beta$ 1 y TIMP1. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde la expresión de diferentes proteínas virales induce la activación de las CEH (Cheng et al., 2017; Coenen et al., 2011; W. Li et al., 2022; Ríos-Ocampo et al., n.d.; Schulze-Krebs et al., 2005). Sin embargo, se encontraron diferencias en la regulación de los distintos marcadores dependiendo de la proteína viral y del tiempo de co-cultivo. Por ejemplo, no se observaron cambios en el nivel de proteína del colageno1 con pCore/HCV o pNluc-NS5A/HCV a las 72 h de co-cultivo en comparación con el grupo control, y a las 48 h si había un aumento pNluc-NS5A/HCV, sugerimos que se pueda estar dando una regulación post-transcripcional y/o que algunas MMPs podría estar participando degradando el colágeno, ya que se ha determinado que las CEH pueden regular los niveles de algunas MMPs durante su activación bajo estímulos específicos (E. H. Lee et al., 2019; T. Liu et al., 2016; Robert et al., 2016). Asimismo, observamos que tanto en el caso de pNluc-NS5A/HCV como pCore/HCV aumenta el nivel de proteína de  $\alpha$ -SMA y a las 72 horas, este se normaliza a niveles semejantes al control, podríamos pensar que existe algún tipo de regulación adicional ya que se ha demostrado que solo el hecho de co-cultivar Huh7 con LX2 puede aumentar los niveles de  $\alpha$ -SMA (Y. Liu et al., 2023). Finalmente, en el co-cultivo observamos que los marcadores de activación de CEH aumentan después de 48

horas de co-cultivo con pCore/HCV. Por otro lado, la transfección con pNluc-NS5A/HCV induce un aumento en los marcadores de activación después de 72 horas de co-cultivo. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la expresión Core/HCV podría inducir la activación de LX2 antes que con pNluc-NS5A/HCV o al menos en diferentes tiempos. Adicionalmente, se evaluó la expresión relativa de 84 genes relacionados con procesos de fibrosis mediante el arreglo de qPCR en las células Huh7 transfectadas y co-cultivadas durante 48 y 72 horas con las LX2. En general, encontramos que los genes SERPINE1, SMAD7, TGFB2, INHBE, LTBP1 y THBS1 fueron sobreexpresados durante los co-cultivos y esto es consistente con la expresión génica inducida por la infección *in vitro* de VHC en células Huh7.5 (Woodhouse et al., 2010). Por lo tanto, podemos inferir que estos genes están regulados por la expresión de las proteínas del VHC. Por otro lado, los genes CCN2, COL3A1, TIMP3, LOX, CXCR4, DCN, TGFB2, THBS1 y STAT1 que se encontraron sobreexpresados durante el co-cultivo coinciden con genes sobreexpresados en el tejido hepático cirrótico derivado de la infección por VHC en comparación con el tejido hepático sano (He et al., 2020; Mas et al., 2009). Esto nos sugiere que el microambiente fue el responsable de regular estos genes, esto generado por la interacción intercelular durante la expresión de las proteínas del VHC en nuestros ensayos. No obstante, ya se han relacionado cada uno de estos genes con procesos involucrados en la fibrosis en general (Bansal et al., 2017; Basyte-Bacevice et al., 2019; Wang et al., 2022; Y. Q. Zhang et al., 2017). De acuerdo con los análisis bioinformáticos, con la transfección de pNluc-NS5A/VHC, encontramos que tanto a las 48 como a las 72 horas de co-cultivo, vías como el TGF $\beta$ 1 y la organización de la matriz extracelular se enriquecieron. Sin embargo, no todos los genes se sobreexpresaban a los mismos tiempos de co-cultivo, o no todos tenían una sobreexpresión constante. Cabe señalar que los genes antifibróticos sobreexpresados como IFNG e IL10 (Weng et al., 2007; L. J. Zhang et al., 2007) solo se obtuvieron a las 48 horas de co-cultivo. Por otro lado, la transfección de pCore/VHC genera subexpresión de diversos genes relacionados con la fibrosis a las 72 h de co-cultivo. Esto podría estar relacionado con el estado de activación del LX2 durante la co-cultivo, ya que a las 72 h no se incrementaron los marcadores de activación.

Nuestros resultados hasta este punto demostraron que la expresión de las proteínas NS5A y Core del VHC en las células Huh7 regulan la activación de las células LX2. Asimismo, ambas estirpes celulares bajo el mismo microambiente regulan diversos procesos que pueden inducir fibrosis. Destacamos la importancia de incluir estudios que demuestren el efecto de la comunicación intercelular en la regulación de los mecanismos moleculares asociados a la infección por VHC. Además, se determinaron firmas genéticas relacionadas con las vías fibróticas derivadas de la expresión de las proteínas NS5A y Core del VHC en células Huh7 co-cultivadas con LX2.

De acuerdo con los análisis derivados del arreglo de qPCR, unas de las principales vías asociadas, además de la señalización del TGF $\beta$ , es la actividad inhibitoria de las tipo serin proteasas. Asimismo, el gen *serpine1* (gen codificante para el inhibidor del activador del plasminógeno tipo1 [PAI-1]) fue de los genes con mayor expresión diferencial durante los ensayos de co-cultivo. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, han reportado perfiles de expresión génica asociados a una infección con el VHC o bien con la expresión de alguna de las proteínas virales, entre estos perfiles de expresión génica pudimos identificar a *serpine1* como uno de los genes diferencialmente expresado asociado a la infección viral o bien, a procesos de fibrosis hepática (Budhu et al., 2007; He et al., 2020; C. Li et al., 2020; Tegtmeier et al., 2021; Woodhouse et al., 2010). Además, se ha demostrado la participación de PAI-1 en distintos procesos celulares, como durante la lesión hepática colestásica y fibrosis (Bergheim et al., 2006), durante la TEM y fibrosis intersticial renal (G. Zhang et al., 2007) y durante la diferenciación de células madre cancerosas inducida por el VHC (Nam, Angelucci, et al., 2021).

Por todo lo anterior fue que se decidió inhibir la expresión y acción de PAI-1 en este estudio. Las células Huh7 después de 24 horas de transfección con pNS5A-Nluc/HCV o pCore/HCV fueron silenciadas con 5nM del siPAI-1 durante 24 y 48 horas, este silenciamiento provocó una disminución de la Vimentina en todos los grupos experimentales. Asimismo, el silenciamiento de PAI-1 logró revertir la disminución de la E-cadherina inducida por pCore/HCV, ambos resultados demuestran la participación de PAI-1 en la modulación de estos dos importantes marcadores de la TEM en las Huh7.

Por otro lado, se decidió utilizar el inhibidor químico TM5275, el cual bloquea la formación del complejo de PAI-1/uPA necesarios para desencadenar la vía molecular efectora (Izuhara et al., 2010). Según nuestros resultados, con TM5275 solo se observó la formación del complejo en las células Huh7 sin transfectar y en las células que expresaron pCore/HCV, y esto promovió a su vez el aumento de la E-cadherina en ambos grupos experimentales. Esto sugiere que el efecto de NS5A pudiera estar bloqueando de alguna manera la acción del TM5275. Ya se ha demostrado que cambios en microambiente celular, desde la presencia de colágeno en la matriz extracelular así como los niveles de aldehído deshidrogenasa (ALDH) puede llegar a modificar los efectos del TM5275, llevando así al bloqueo de su acción (Sato et al., 2016). Asimismo, se ha demostrado que el VHC puede llegar a promover la producción de colágeno (Reungoat et al., 2021). Sin embargo, el TM5275 logró disminuir los niveles de TGF- $\beta$ 1 tanto en el grupo control como en las células transfectadas con pNluc-NS5A/HCV, lo cual sugiere que, Core puede modular este efecto, y que el TM5275 pueda ejercer otra vía de inhibición para el TGF- $\beta$ 1. La participación de PAI-1 en la TEM de Huh7 inducida por las proteínas NS5A y Core del VHC fue demostrada en nuestro estudio, lo cual se asociada con lo antes visto por Nam y colaboradores en el 2021, cuando observaron que PAI-1 puede modular otros marcadores de TEM asociados a la infección por el VHC (Nam, Angelucci, et al., 2021), y por lo reportado por Zhang y colaboradores en el 2007 donde PAI-1 tiene un rol importante en la TEM durante la fibrosis renal (G. Zhang et al., 2007). No obstante, cabe destacar que el uso de TM5275 ya ha sido probado en modelos *in vivo*, donde se ha demostrado que puede revertir la activación de células estelares hepáticas en modelos murinos de fibrosis hepática. Por lo tanto, aun es de gran importancia el estudio de la participación de PAI-1 en la regulación de activación de las LX2 inducidas por el VHC, ya que la elucidación de los mecanismos moleculares durante la comunicación intercelular asociados a la fisiopatología de la fibrosis desencadenada por el VHC es de gran importancia ya que repercutirá en la identificación y elección de nuevos blancos moleculares asociados a las terapias antifibróticas.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se estableció el sistema de expresión transitoria de la proteína NS5A y Core del VHC en células Huh7.
2. La expresión transitoria de NS5A del VHC promovió la migración celular, la sobreexpresión de TGF $\beta$ 1 y Snail, y la subexpresión de E-cadherina sugiriendo que se activó el proceso de la TEM en células Huh7.
3. La expresión transitoria de Core del VHC indujo la sobreexpresión de Snail y una subexpresión de E-cadherina, sugiriendo que se lleva a cabo la TEM de Huh7.
4. La expresión transitoria de NS5A y Core del VHC en células Huh7 co-cultivadas con LX2 indujeron la sobreexpresión de TGF $\beta$ 1, Col1 $\alpha$ 1 y Timp1, sugiriendo la activación de LX2 por estas proteínas virales.
5. Se determinó un perfil de expresión génica que permite asociar la TEM de células Huh7 y activación de células LX2 inducido por la expresión de NS5A y Core del VHC.
6. El perfil de expresión génica sugiere que los factores PAI-1 e INHBE pueden actuar como posibles blancos moleculares para la regulación de la TEM de células Huh7 y activación de LX2.
7. El silenciamiento y la inhibición farmacológica de PAI-1 disminuyó la expresión del TGF $\beta$ 1 y de la vimentina, y aumentó la expresión de E-cadherina. Esto sugiere que PAI-1 está involucrado en la regulación de la TEM de células Huh7.
8. El silenciamiento y la inhibición farmacológica de PAI-1 en presencia de la proteína Core o NS5A del VHC, no tuvo el mismo efecto ya que no se observó cambio en la expresión traduccional del TGF $\beta$ 1 o de la E-cadherina respectivamente. Esto sugiere que las proteínas NS5A y Core del VHC pueden modular este tipo de regulación en células Huh7.
9. Los genes diferencialmente expresados inducidos por NS5A y Core del VHC en las Huh7 co-cultivadas con LX2 se asociaron a la señalización de TGF $\beta$ 1 y a la organización de la matriz extracelular, esto sugiere que estos mecanismos a nivel transcripcional están involucrados en la TEM de Huh7 y la activación de CEH-LX2 durante la expresión de las proteínas NS5A y Core del VHC.

## **10. PERSPECTIVAS**

1. Evaluar la participación de PAI-1 en la regulación de la activación de CEH inducida por NS5A y Core del VHC.
2. Evaluar mecanismos moleculares asociados a la TEM inducidos por el VHC en un modelo celular de hepatocitos no tumorales.
3. Evaluar mediante análisis transcriptómicos, los genes diferencialmente expresados durante la TEM y activación de CEH inducidos por el VHC.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Afdhal, N. H. (2004). The natural history of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*, 24(SUPPL. 2), 3–8. <https://doi.org/10.1055/s-2004-832922>
- Agnello, V., Ábel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12766–12771. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12766>
- Aicher, S., Kakkanas, A., Cohen, L., Blumen, B., Oprisan, G., Njouom, R., Meurs, E. F., Mavromara, P., and Martin, A. (2018). Differential regulation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by hepatitis C virus recombinants expressing core from various genotypes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29078-2>
- Akkari, L., Grégoire, D., Floc'H, N., Moreau, M., Hernandez, C., Simonin, Y., Rosenberg, A. R., Lassus, P., and Hibner, U. (2012). Hepatitis C viral protein NS5A induces EMT and participates in oncogenic transformation of primary hepatocyte precursors. *Journal of Hepatology*, 57(5), 1021–1028. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.06.027>
- Alter, H. J., Holland, P. V., Purcell, R. H., and Popper, H. (1978). Transmissible Agent in Non-a, Non-B Hepatitis. *The Lancet*, 311(8062), 459–463. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)90131-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)90131-9)
- Alter, H. J., and Seeff, L. B. (2000). Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: A perspective on long-term outcome. *Seminars in Liver Disease*, 20(1), 17–35. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9505>
- Arora, P., Kim, E. O., Jung, J. K., and Jang, K. L. (2008). Hepatitis C virus core protein downregulates E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1 and 3b. *Cancer Letters*, 261(2), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.11.033>



- Arzumanyan, A., Reis, H. M. G. P. V., and Feitelson, M. A. (2013). Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Cancer*, *13*(2), 123–135. <https://doi.org/10.1038/nrc3449>
- Bansal, R., Nakagawa, S., Yazdani, S., van Baarlen, J., Venkatesh, A., Koh, A. P., Song, W. M., Goossens, N., Watanabe, H., Beasley, M. B., Powell, C. A., Storm, G., Kaminski, N., van Goor, H., Friedman, S. L., Hoshida, Y., and Prakash, J. (2017). Integrin alpha 11 in the regulation of the myofibroblast phenotype: Implications for fibrotic diseases. *Experimental and Molecular Medicine*, *49*(11), e396–e396. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.213>
- Bartenschlager, R., Frese, M., and Pietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in Virus Research*, *63*, 71–180. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(04\)63002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(04)63002-8)
- Basyte-Bacevice, V., Skieceviciene, J., Valantiene, I., Sumskiene, J., Petrenkiene, V., Kondrackiene, J., Petrauskas, D., Lammert, F., and Kupcinskis, J. (2019). Serpina1 and hsd17b13 gene variants in patients with liver fibrosis and cirrhosis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, *28*(3), 297–302. <https://doi.org/10.15403/jgld-168>
- Benkheil, M., Paeshuyse, J., Neyts, J., Van Haele, M., Roskams, T., and Liekens, S. (2018). HCV-induced EGFR-ERK signaling promotes a pro-inflammatory and pro-angiogenic signature contributing to liver cancer pathogenesis. *Biochemical Pharmacology*, *155*, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.011>
- Benova, L., Mohamoud, Y. A., Calvert, C., and Abu-Raddad, L. J. (2014). Vertical transmission of hepatitis C virus: Systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, *59*(6), 765–773. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu447>
- Bergamini, and Sgarra. (2008). Laminin-5 stimulates hepatocellular carcinoma growth through a different function of  $\alpha 6\beta 4$  and  $\alpha 3\beta 1$  integrins (Hepatology (2007) (1801-1809)). *Hepatology*, *47*(3), 1102. <https://doi.org/10.1002/hep.22230>

- Bergheim, I., Guo, L., Davis, M. A., Duveau, I., and Arteel, G. E. (2006). Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2), 592–600. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.095042>
- Böttcher, K., and Pinzani, M. (2017). Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 121, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.016>
- Breitkopf, K., Godoy, P., Ciucan, L., Singer, M. V., and Dooley, S. (2006). TGF- $\beta$ /Smad signaling in the injured liver. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 44(1), 57–66. <https://doi.org/10.1055/s-2005-858989>
- Bruckner-Tuderman, L., and Bruckner, P. (1998). Genetic diseases of the extracellular matrix: More than just connective tissue disorders. *Journal of Molecular Medicine*, 76(3–4), 226–237. <https://doi.org/10.1007/s001090050213>
- Budhu, A., Chen, Y., Kim, J. W., Forgues, M., Valerie, K., Harris, C. C., and Wang, X. W. (2007). Induction of a unique gene expression profile in primary human hepatocytes by hepatitis C virus core, NS3 and NS5A proteins. *Carcinogenesis*, 28(7), 1552–1560. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm075>
- Bukh, J. (2016). The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *Journal of Hepatology*, 65(1), S2–S21. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.035>
- Cheng, J. C., Tseng, C. P., Liao, M. H., Peng, C. Y., Yu, J. S., Chuang, P. H., Huang, J. T., and Chen, J. J. W. (2017). Activation of hepatic stellate cells by the ubiquitin C-terminal hydrolase 1 protein secreted from hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 4448. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04259-7>
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit,

- D., Medina-Selby, A., Barr, P. J., Weiner, A. J., Bradley, D. W., Kuo, G., and Houghton, M. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2451–2455. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2451>
- Choo, Qui Lim, Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), 359–362. <https://doi.org/10.1126/science.2523562>
- Chusri, P., Kumthip, K., Hong, J., Zhu, C., Duan, X., Jilg, N., Fusco, D. N., Brisac, C., Schaefer, E. A., Cai, D., Peng, L. F., Maneekarn, N., Lin, W., and Chung, R. T. (2016). HCV induces transforming growth factor  $\beta$ 1 through activation of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Scientific Reports*, 6, 22487. <https://doi.org/10.1038/srep22487>
- Clément, S., Pascarella, S., Conzelmann, S., Gonelle-Gispert, C., Guilloux, K., and Negro, F. (2010). The hepatitis C virus core protein indirectly induces alpha-smooth muscle actin expression in hepatic stellate cells via interleukin-8. *Journal of Hepatology*, 52(5), 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.10.035>
- Cocquerel, L., Meunier, J.-C., Pillez, A., Wychowski, C., and Dubuisson, J. (1998). A Retention Signal Necessary and Sufficient for Endoplasmic Reticulum Localization Maps to the Transmembrane Domain of Hepatitis C Virus Glycoprotein E2. *Journal of Virology*, 72(3), 2183–2191. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.3.2183-2191.1998>
- Cocquerel, L., Voisset, C., and Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: Potential receptors and their biological functions. *Journal of General Virology*, 87(5), 1075–1084. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81646-0>
- Coenen, M., Nischalke, H. D., Krämer, B., Langhans, B., Glässner, A., Schulte, D., Körner, C., Sauerbruch, T., Nattermann, J., and Spengler, U. (2011). Hepatitis C virus core protein induces fibrogenic actions of hepatic stellate cells via toll-like

receptor 2. *Laboratory Investigation*, 91(9), 1375–1382.  
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.78>

Dang, H., Yeo, Y. H., Yasuda, S., Huang, C., Iio, E., Landis, C., Jun, D. W., Enomoto, M., Ogawa, E., Tsai, P., Le, A., Liu, M., Maeda, M., Nguyen, B., Ramrakhiani, N., Henry, L., Cheung, R., Tamori, A., Kumada, T., ... Nguyen, M. H. (2019). Cure with Interferon Free DAA is Associated with Increased Survival in Patients with HCV related HCC from both East and West. *Hepatology*, 0–2.

Dash, S., Aydin, Y., Widmer, K. E., and Nayak, L. (2020). <p>Hepatocellular Carcinoma Mechanisms Associated with Chronic HCV Infection and the Impact of Direct-Acting Antiviral Treatment</p>. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 7, 45–76. <https://doi.org/10.2147/jhc.s221187>

De Jesús-Caraballo, J., Toro, D. H., Rodríguez-Pérez, F., Ruiz, H., Dueño, M. I., Alvarez, M., and Suárez-Pérez, E. (2008). Sexual activity as a risk factor for hepatitis C in Puerto Rico. *Boletín de La Asociación Médica de Puerto Rico*, 100(3), 15–20. <https://doi.org/10.14309/00000434-200410001-00262>

Desai, A., Sandhu, S., Lai, J. P., and Sandhu, D. S. (2019). Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World Journal of Hepatology*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i1.1>

Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., and Meindl-Beinker, A. N. (2019). TGF- $\beta$  in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis-Updated 2019. *Cells*, 8(11), 1419. <https://doi.org/10.3390/cells8111419>

Dubuisson, J., Penin, F., and Moradpour, D. (2002). Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends in Cell Biology*, 12(11), 517–523. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02383-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02383-8)

Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002). Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane

- Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology*, 76(12), 5974–5984. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.12.5974-5984.2002>
- Evans, M. J., Von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., and Rice, C. M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446(7137), 801–805. <https://doi.org/10.1038/nature05654>
- Fabrizi, F., Martin, P., and Messa, P. (2013). Control of HCV, HBV and HIV Infections in Hemodialysis. *Giornale Italiano Di Nefrologia : Organo Ufficiale Della Societa Italiana Di Nefrologia*, 30(4), gin-30.
- Farci, P., Alter, H. J., Shimoda, A., Govindarajan, S., Cheung, L. C., Melpolder, J. C., Sacher, R. A., Shih, J. W., and Purcell, R. H. (1996). Hepatitis C Virus–Associated Fulminant Hepatic Failure. *New England Journal of Medicine*, 335(9), 631–634. <https://doi.org/10.1056/nejm199608293350904>
- Farci, P., Alter, H. J., Wong, D., Miller, R. H., Shih, J. W., Jett, B., and Purcell, R. H. (1991). A Long-Term Study of Hepatitis C Virus Replication in Non-A, Non-B Hepatitis. *New England Journal of Medicine*, 325(2), 98–104. <https://doi.org/10.1056/nejm199107113250205>
- Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J., Holland, P. V., and Zuckerman, J. (2001). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *Reviews in Medical Virology*, 11(1), 3–9. <https://doi.org/10.1002/rmv.304>
- Fissell, R. B., Bragg-Gresham, J. L., Woods, J. D., Jadoul, M., Gillespie, B., Hedderwick, S. A., Rayner, H. C., Greenwood, R. N., Akiba, T., and Young, E. W. (2004). Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: The DOPPS. *Kidney International*, 65(6), 2335–2342. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00649.x>
- Flemming, J. A., Kim, W. R., Brosgart, C. L., and Terrault, N. A. (2017). Reduction in

- liver transplant wait-listing in the era of direct-acting antiviral therapy. *Hepatology*, 65(3), 804–812. <https://doi.org/10.1002/hep.28923>
- Frick, D. N., Rypma, R. S., Lam, A. M. I., and Gu, B. (2004). The Nonstructural Protein 3 Protease/Helicase Requires an Intact Protease Domain to Unwind Duplex RNA Efficiently. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1269–1280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310630200>
- Gale, M. J., Korth, M. J., and Katze, M. G. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: A potential mechanism of interferon resistance. *Clinical and Diagnostic Virology*, 10(2–3), 157–162. [https://doi.org/10.1016/S0928-0197\(98\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0928-0197(98)00034-8)
- Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W., and Lai, M. M. C. (2004). Interactions between Viral Nonstructural Proteins and Host Protein hVAP-33 Mediate the Formation of Hepatitis C Virus RNA Replication Complex on Lipid Raft. *Journal of Virology*, 78(7), 3480–3488. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3480-3488.2004>
- Giannelli, G., Bergamini, C., Fransvea, E., Sgarra, C., and Antonaci, S. (2006). Erratum: Laminin-5 with transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma (*Gastroenterology* (2005) 128 (1375-1383)). *Gastroenterology*, 130(1), 287. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.043>
- Giannelli, Gianluigi, Koudelkova, P., Dituri, F., and Mikulits, W. (2016). Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 65(4), 798–808. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.007>
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003). Identification of the Hepatitis C Virus RNA Replication Complex in Huh-7 Cells Harboring Subgenomic Replicons. *Journal of Virology*, 77(9), 5487–5492. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.9.5487-5492.2003>
- Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K., and Razavi, H. (2014). Global

- epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 61(1), S45–S57. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.027>
- Greenburg, G., and Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology*, 95(1), 333–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333>
- Gretton, S. N., Taylor, A. I., and McLauchlan, J. (2005). Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *Journal of General Virology*, 86(5), 1415–1421. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80768-0>
- Guess, C. M., and Quaranta, V. (2009). Defining the role of laminin-332 in carcinoma. *Matrix Biology*, 28(8), 445–455. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.07.008>
- Guidi, M., Muratori, P., Granito, A., Muratori, L., Lenzi, M., and Bianchi, F. B. (2006). Steatosis in chronic hepatitis C [2]. *Gut*, 55(7), 1047.
- He, L., Yuan, H., Liang, J., Hong, J., and Qu, C. (2020). Expression of hepatic stellate cell activation-related genes in HBV-, HCV-, and nonalcoholic fatty liver disease-associated fibrosis. *PLoS ONE*, 15(5), e0233702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233702>
- Hellerbrand, C., Stefanovic, B., Giordano, F., Burchardt, E. R., and Brenner, D. A. (1999). The role of TGF $\beta$ 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *Journal of Hepatology*, 30(1), 77–87. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80010-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80010-5)
- Houghton, M. (2019). The Discovery of the Hepatitis C Virus. *Topics in Medicinal Chemistry*, 31, 19–27. [https://doi.org/10.1007/7355\\_2018\\_53](https://doi.org/10.1007/7355_2018_53)
- Hu, B., Xie, S., Hu, Y., Chen, W., Chen, X., Zheng, Y., and Wu, X. (2017). Hepatitis C virus NS4B protein induces epithelial-mesenchymal transition by upregulation of Snail. *Virology Journal*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0737-1>

- Ioannou, G. N., Beste, L. A., Green, P. K., Singal, A. G., Tapper, E. B., Waljee, A. K., Sterling, R. K., Feld, J. J., Kaplan, D. E., Taddei, T. H., and Berry, K. (2019). Increased Risk for Hepatocellular Carcinoma Persists Up to 10 Years After HCV Eradication in Patients With Baseline Cirrhosis or High FIB-4 Scores. *Gastroenterology*, *157*(5), 1264-1278.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.033>
- Irshad, M., Gupta, P., and Irshad, K. (2017). Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection. *World Journal of Hepatology*, *9*(36), 1305–1314. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i36.1305>
- Izuhara, Y., Yamaoka, N., Kodama, H., Dan, T., Takizawa, S., Hirayama, N., Meguro, K., Van Ypersele De Strihou, C., and Miyata, T. (2010). A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *30*(5), 904–912. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.272>
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J. Y., Wang, C., Mezey, E., and Koteish, A. (2007). Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(30), 22089–22101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700998200>
- Kakumu, S., Yoshioka, K., Wakita, T., Ishikawa, T., Takayanagi, M., and Higashi, Y. (1993). Pilot study of ribavirin and interferon- $\beta$  for chronic hepatitis B. *Hepatology*, *18*(2), 258–263. <https://doi.org/10.1002/hep.1840180206>
- Kao, C. C., Yang, X., Kline, A., Wang, Q. M., Barket, D., and Heinz, B. A. (2000). Template Requirements for RNA Synthesis by a Recombinant Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Virology*, *74*(23), 11121–11128. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.11121-11128.2000>
- Kapadia, S. B., and Chisari, F. V. (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(12), 4175–4180. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408100102>



- Sciences of the United States of America*, 102(7), 2561–2566.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0409834102>
- Karageorgopoulos, D. E., Allen, J., and Bhagani, S. (2015). Hepatitis C in human immunodeficiency virus co-infected individuals: Is this still a “special population”? *World Journal of Hepatology*, 7(15), 1936–1952.  
<https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i15.1936>
- Kawaguchi, Y., and Mizuta, T. (2014). Interaction between hepatitis C virus and metabolic factors. *World Journal of Gastroenterology*, 20(11), 2888–2901.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i11.2888>
- Ke, A., Shi, G., Zhou, J., Huang, X., Shi, Y., Ding, Z., Wang, X., Devbhandari, R. P., and Fan, J. (2011). CD151 amplifies signaling by integrin  $\alpha 6\beta 1$  to PI3K and induces the epithelial-mesenchymal transition in HCC cells. *Gastroenterology*, 140(5), 1629–1641. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.008>
- Klein, K. C., Dellos, S. R., and Lingappa, J. R. (2005). Identification of Residues in the Hepatitis C Virus Core Protein That Are Critical for Capsid Assembly in a Cell-Free System. *Journal of Virology*, 79(15), 10098–10098.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.79.15.10098.2005>
- Kolykhalov, A. A., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of Virology*, 70(6), 3363–3371. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.6.3363-3371.1996>
- Koutsoudakis, G., Kaul, A., Steinmann, E., Kallis, S., Lohmann, V., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2006). Characterization of the Early Steps of Hepatitis C Virus Infection by Using Luciferase Reporter Viruses. *Journal of Virology*, 80(11), 5308–5320. <https://doi.org/10.1128/jvi.02460-05>
- Krugman, S., Giles, J. P., and Hammond, J. (1967). Infectious Hepatitis: Evidence for

- Two Distinctive Clinical, Epidemiological, and Immunological Types of Infection. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 200(5), 365–373. <https://doi.org/10.1001/jama.200.5.365>
- Kunkel, M., Lorinczi, M., Rijnbrand, R., Lemon, S. M., and Watowich, S. J. (2001). Self-Assembly of Nucleocapsid-Like Particles from Recombinant Hepatitis C Virus Core Protein. *Journal of Virology*, 75(5), 2119–2129. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.5.2119-2129.2001>
- Lamarre, D., Anderson, P. C., Bailey, M., Beaulieu, P., Bolger, G., Bonneau, P., Bös, M., Cameron, D. R., Cartier, M., Cordingley, M. G., Faucher, A. M., Goudreau, N., Kawai, S. H., Kukolj, G., Lagacé, L., LaPlante, S. R., Narjes, H., Poupart, M. A., Rancourt, J., ... Llinàs-Brunet, M. (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature*, 426(6963), 186–189. <https://doi.org/10.1038/nature02099>
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lee, E. H., Park, K. Il, Kim, K. Y., Lee, J. H., Jang, E. J., Ku, S. K., Kim, S. C., Suk, H. Y., Park, J. Y., Baek, S. Y., and Kim, Y. W. (2019). Liquiritigenin inhibits hepatic fibrogenesis and TGF- $\beta$ 1/Smad with Hippo/YAP signal. *Phytomedicine*, 62, 152780. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.12.003>
- Lee, S. J., Kim, K. H., and Park, K. K. (2014). Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition. *World Journal of Hepatology*, 6(4), 207–216. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i4.207>
- Li, C., Lu, L., Qi, Z., Zhu, Y., Su, F., Zhao, P., and Dong, H. (2020). Transcriptome and miRNome Analysis Provide New Insight Into Host Lipid Accumulation, Innate Immunity, and Viral Persistence in Hepatitis C Virus Infection in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 11, 535673. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.535673>

- Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C. M., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., and Lemon, S. M. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 2992–2997. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408824102>
- Li, W., Duan, X., Zhu, C., Liu, X., Jeyarajan, A. J., Xu, M., Tu, Z., Sheng, Q., Chen, D., Zhu, C., Shao, T., Cheng, Z., Salloum, S., Schaefer, E. A., Kruger, A. J., Holmes, J. A., Chung, R. T., and Lin, W. (2022). Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infection Promote Liver Fibrogenesis through a TGF- $\beta$ 1-Induced OCT4/Nanog Pathway. *The Journal of Immunology*, 208(3), 672–684. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001453>
- Lin, W., Tsai, W. L., Shao, R. X., Wu, G., Peng, L. F., Barlow, L. L., Chung, W. J., Zhang, L., Zhao, H., Jang, J. Y., and Chung, R. T. (2010). Hepatitis C Virus Regulates Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Production Through the Generation of Reactive Oxygen Species in a Nuclear Factor  $\kappa$ B-Dependent Manner. *Gastroenterology*, 138(7), 2509–2518. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.008>
- Liu, T., Wang, P., Cong, M., Zhang, D., Liu, L., Li, H., Zhai, Q., Li, Z., Jia, J., and You, H. (2016). Matrix metalloproteinase-1 induction by diethyldithiocarbamate is regulated via Akt and ERK/miR222/ETS-1 pathways in hepatic stellate cells. *Bioscience Reports*, 36(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20160111>
- Liu, Y., Yang, X., Jiang, D., Hu, R., Huang, F., Zou, X., Liu, C., and Peng, Z. (2023). 3D biomimetic tumor microenvironment of HCC to visualize the intercellular crosstalk between hepatocytes, hepatic stellate cells, and cancer cells. *Smart Materials in Medicine*, 4, 384–395. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2022.12.002>
- Lledó, G. M., Carrasco, I., Benítez-Gutiérrez, L. M., Arias, A., Royuela, A., Requena, S., Cuervas-Mons, V., and de Mendoza, C. (2018). Regression of liver fibrosis after curing chronic hepatitis C with oral antivirals in patients with and without HIV

- coinfection. *AIDS (London, England)*, 32(16), 2347–2352.  
<https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001966>
- Lohmann, V., Roos, A., Körner, F., Koch, J. O., and Bartenschlager, R. (2000). Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA-dependent RNA polymerase of the hepatitis C virus. *Journal of Viral Hepatitis*, 7(3), 167–174.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2000.00218.x>
- López-Nouoa, J. M., and Nieto, M. A. (2009). Inflammation and EMT: An alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Molecular Medicine*, 1(6–7), 303–314. <https://doi.org/10.1002/emmm.200900043>
- Majeau, N., Gagné, V., Boivin, A., Bolduc, M., Majeau, J. A., Ouellet, D., and Leclerc, D. (2004). The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. *Journal of General Virology*, 85(4), 971–981.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.79775-0>
- Mas, V. R., Maluf, D. G., Archer, K. J., Yanek, K., Kong, X., Kulik, L., Freise, C. E., Olthoff, K. M., Ghobrial, R. M., McIver, P., and Fisher, R. (2009). Genes involved in viral carcinogenesis and tumor initiation in hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine*, 15(3–4), 85–94.  
<https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00110>
- McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO Journal*, 21(15), 3980–3988. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf414>
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, 437(7062), 1167–1172.  
<https://doi.org/10.1038/nature04193>
- Mitchell, J. K., Lemon, S. M., and McGivern, D. R. (2015). How do persistent infections

with hepatitis C virus cause liver cancer? *Current Opinion in Virology*, 14, 101–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.09.003>

Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C. (2012). Replication of Hepatitis C Virus. *Zakim and Boyer's Hepatology*, 5(6), 97–110. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0881-3.00007-3>

Nahon P, Bourcier V, L. R. (2017). Eradication of Hepatitis C in patients with Cirrhosis reduces the risk of Liver and no Liver complications. *Gastroenterology*, 152(1), 142–156. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508516350703>

Nahon, P., Layese, R., Bourcier, V., Cagnot, C., Marcellin, P., Guyader, D., Pol, S., Larrey, D., De Lédighen, V., Ouzan, D., Zoulim, F., Roulot, D., Tran, A., Bronowicki, J. P., Zarski, J. P., Riachi, G., Calès, P., Péron, J. M., Alric, L., ... Hillaire, S. (2018). Incidence of Hepatocellular Carcinoma After Direct Antiviral Therapy for HCV in Patients With Cirrhosis Included in Surveillance Programs. *Gastroenterology*, 155(5), 1436-1450.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.015>

Nakano, M., Koga, H., Ide, T., Kuromatsu, R., Hashimoto, S., Yatsunami, H., Seike, M., Higuchi, N., Nakamura, M., Shikado, S., Sakisaka, S., Miuma, S., Nakao, K., Yoshimaru, Y., Sasaki, Y., Oeda, S., Eguchi, Y., Honma, Y., Harada, M., ... Torimura, T. (2019). Predictors of hepatocellular carcinoma recurrence associated with the use of direct-acting antiviral agent therapy for hepatitis C virus after curative treatment: A prospective multicenter cohort study. *Cancer Medicine*, 8(5), 2646–2653. <https://doi.org/10.1002/cam4.2061>

Nam, D., Angelucci, A., Choi, D., Leigh, A., Seong, H. C., and Hahn, Y. S. (2021). Elevation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Differentiation of Cancer Stem-Like Cell State by Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology*, 95(10), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/jvi.02057-20>

Nam, D., Seong, H. C., and Hahn, Y. S. (2021). Plasminogen Activator Inhibitor-1 and

- Oncogenesis in the Liver Disease. *Journal of Cellular Signaling*, 2(3), 221. <https://doi.org/10.33696/signaling.2.054>
- Nie, D., Shan, X., Nie, L., Duan, Y., Chen, Z., Yang, Y., Li, Z., Tian, L., Gao, Q., Shan, Y., and Tang, N. (2016). Hepatitis C virus core protein interacts with Snail and histone deacetylases to promote the metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 35(28), 3626–3635. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.428>
- Oh, J.-W., Ito, T., and Lai, M. M. C. (1999). A Recombinant Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Capable of Copying the Full-Length Viral RNA. *Journal of Virology*, 73(9), 7694–7702. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.9.7694-7702.1999>
- Paradis, V., Zalisnski, S., Chelbi, E., Guedj, N., Degos, F., Vilgrain, V., Bedossa, P., and Belghiti, J. (2009). Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liverfibrosis: A pathological analysis. *Hepatology*, 49(3), 851–859. <https://doi.org/10.1002/hep.22734>
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282(5390), 938–941. <https://doi.org/10.1126/science.282.5390.938>
- Piñero, F., Mendizabal, M., Ridruejo, E., Herz Wolff, F., Ameigeiras, B., Anders, M., Schinoni, M. I., Reggiardo, V., Palazzo, A., Videla, M., Alonso, C., Santos, L., Varón, A., Figueroa, S., Vistarini, C., Adrover, R., Fernández, N., Perez, D., Tanno, F., ... Silva, M. (2019). Treatment with direct-acting antivirals for HCV decreases but does not eliminate the risk of hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 39(6), 1033–1043. <https://doi.org/10.1111/liv.14041>
- Pinzani, M. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in chronic liver disease: Fibrogenesis or escape from death? *Journal of Hepatology*, 55(2), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.001>

- Ramadori, G., and Meier, V. (2001). Hepatitis c virus infection: 10 years after the discovery of the virus. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *13*(5), 465–471. <https://doi.org/10.1097/00042737-200105000-00001>
- Razavi, H. (2020). Global Epidemiology of Viral Hepatitis. *Gastroenterology Clinics of North America*, *49*(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.01.001>
- Reungoat, E., Grigorov, B., Zoulim, F., and Pécheur, E. I. (2021). Molecular crosstalk between the hepatitis c virus and the extracellular matrix in liver fibrogenesis and early carcinogenesis. *Cancers*, *13*(9), 2270. <https://doi.org/10.3390/cancers13092270>
- Ríos-Ocampo, W. A., Navas, M.-C., Faber, K. N., Daemen, T., and Moshage, H. (n.d.). *Huh7 cells expressing hepatitis C virus Core or NS3/4A protein activate human LX-2 hepatic stellate cells through paracrine signaling: preliminary results.*
- Robert, S., Gicquel, T., Bodin, A., Lagente, V., and Boichot, E. (2016). Characterization of the MMP/TIMP imbalance and collagen production induced by IL-1  $\beta$  or TNF- $\alpha$  release from human hepatic stellate cells. *PLoS ONE*, *11*(4), e0153118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153118>
- Saab, S., Rheem, J., and Sundaram, V. (2015). Hepatitis C Infection in the Elderly. *Digestive Diseases and Sciences*, *60*(11), 3170–3180. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3717-6>
- Sakai, A., St. Claire, M., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (2003). The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11646–11651. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834545100>
- Salonen, A., Ahola, T., and Kääriäinen, L. (2004). Viral RNA replication in association with cellular membranes. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol.

285, pp. 139–173). Springer. [https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6\\_5](https://doi.org/10.1007/3-540-26764-6_5)

Santamato, A., Fransvea, E., Dituri, F., Caligiuri, A., Quaranta, M., Niimi, T., Pinzani, M., Antonaci, S., and Giannelli, G. (2011). Hepatic stellate cells stimulate HCC cell migration via laminin-5 production. *Clinical Science*, *121*(4), 159–168. <https://doi.org/10.1042/CS20110002>

Sato, M., Kawana, K., Adachi, K., Fujimoto, A., Yoshida, M., Nakamura, H., Nishida, H., Inoue, T., Taguchi, A., Takahashi, J., Kojima, S., Yamashita, A., Tomio, K., Nagamatsu, T., Wada-Hiraike, O., Oda, K., Osuga, Y., and Fujii, T. (2016). Decreased expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 is involved in degradation of extracellular matrix surrounding cervical cancer stem cells. *International Journal of Oncology*, *48*(2), 829–835. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3283>

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO Journal*, *21*(19), 5017–5025. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf529>

Schulze-Krebs, A., Preimel, D., Popov, Y., Bartenschlager, R., Lohmann, V., Pinzani, M., and Schuppan, D. (2005). Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology*, *129*(1), 246–258. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.089>

Sedeño-Monge, V., Laguna-Meraz, S., Santos-López, G., Panduro, A., Sosa-Jurado, F., Jose-Abrego, A., Meléndez-Mena, D., Muñoz-Ramírez, M. A., Cosme-Chávez, M., and Roman, S. (2021). A comprehensive update of the status of hepatitis C virus (HCV) infection in Mexico—A systematic review and meta-analysis (2008–2019). *Annals of Hepatology*, *20*, 100292. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2020.100292>

Seo, J. Y., Park, J., Yu, M. R., Kim, Y. S., Ha, H., and Lee, H. B. (2009). Positive feedback loop between plasminogen activator inhibitor-1 and transforming growth factor-



beta1 during renal fibrosis in diabetes. *American Journal of Nephrology*, 30(6), 481–490. <https://doi.org/10.1159/000242477>

Serafino, A., Valli, M. B., Andreola, F., Crema, A., Ravagnan, G., Bertolini, L., and Carloni, G. (2003). Suggested role of the golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *Journal of Medical Virology*, 70(1), 31–41. <https://doi.org/10.1002/jmv.10367>

Shahin, K., Hosseini, S. Y., Jamali, H., Karimi, M. H., Azarpira, N., and Zeraatian, M. (2020). The enhancing impact of amino termini of hepatitis C virus core protein on activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 13(1), 57–63. <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v13i1.1668>

Shi, S. T., Lee, K.-J., Aizaki, H., Hwang, S. B., and Lai, M. M. C. (2003). Hepatitis C Virus RNA Replication Occurs on a Detergent-Resistant Membrane That Cofractionates with Caveolin-2. *Journal of Virology*, 77(7), 4160–4168. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.7.4160-4168.2003>

Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1999). Interaction of Hepatitis C Virus Core Protein with Viral Sense RNA and Suppression of Its Translation. *Journal of Virology*, 73(12), 9718–9725. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.12.9718-9725.1999>

Simmonds, P., Holmes, E. C., Cha, T. A., Chan, S. W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P. L., Kolberg, J., and Urdea, M. S. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology*, 74(11), 2391–2399. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-11-2391>

Smith, D. B., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A. S., Rice, C. M., Stapleton, J. T., and Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource.

*Hepatology*, 59(1), 318–327. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>

- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., and Von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(1 D), D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Tan, S. L., and Katze, M. G. (2001). How hepatitis C virus counteracts the interferon response: The jury is still out on NS5A. *Virology*, 284(1), 1–12. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0885>
- Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (2000). Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology*, 270(1), 229–236. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0252>
- Tegtmeyer, B., Vieyres, G., Todt, D., Lauber, C., Ginkel, C., Engelmann, M., Herrmann, M., Pfaller, C. K., Vondran, F. W. R., Broering, R., Vafadarnejad, E., Saliba, A.-E., Puff, C., Baumgärtner, W., Miskey, C., Ivics, Z., Steinmann, E., Pietschmann, T., and Brown, R. J. P. (2021). Initial Hepatitis C Virus Infection of Adult Hepatocytes Triggers a Temporally Structured Transcriptional Program Containing Diverse Pro- and Antiviral Elements. *Journal of Virology*, 95(10), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/jvi.00245-21>
- Terrault, N. A., Dodge, J. L., Murphy, E. L., Tavis, J. E., Kiss, A., Levin, T. R., Gish, R. G., Busch, M. P., Reingold, A. L., and Alter, M. J. (2013). Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: The HCV partners study. *Hepatology*, 57(3), 881–889. <https://doi.org/10.1002/hep.26164>
- Thibeault, D., Maurice, R., Pilote, L., Lamarre, D., and Pause, A. (2001). In Vitro Characterization of a Purified NS2/3 Protease Variant of Hepatitis C Virus. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46678–46684.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M108266200>

- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C., and Chisari, F. V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 194(10), 1395–1406. <https://doi.org/10.1084/jem.194.10.1395>
- Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2006). Time- and Temperature-Dependent Activation of Hepatitis C Virus for Low-pH-Triggered Entry. *Journal of Virology*, 80(4), 1734–1741. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.4.1734-1741.2006>
- Tsuchida, T., and Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(7), 397–411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
- Tu, H., Gao, L., Shi, S. T., Taylor, D. R., Yang, T., Mircheff, A. K., Wen, Y., Gorbalenya, A. E., Hwang, S. B., and Lai, M. M. C. (1999). Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein. *Virology*, 263(1), 30–41. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9893>
- Van Roy, F. (2014). Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(2), 121–134. <https://doi.org/10.1038/nrc3647>
- Vandelli, C., Renzo, F., Romanò, L., Tisminetzky, S., De Palma, M., Stroffolini, T., Ventura, E., and Zanetti, A. (2004). Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: Results of a 10-year prospective follow-up study. In *American Journal of Gastroenterology* (Vol. 99, Issue 5, pp. 855–859). LWW. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.04150.x>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), 1–

12.

- Wang, Y., Hamang, M., Culver, A., Jiang, H., Yanum, J., Garcia, V., Lee, J., White, E., Kusumanchi, P., Chalasani, N., Liangpunsakul, S., Yaden, B. C., and Dai, G. (2022). Activin B promotes the initiation and progression of liver fibrosis. *Hepatology Communications*, 6(10), 2812–2826. <https://doi.org/10.1002/hep4.2037>
- Weng, H., Mertens, P. R., Gressner, A. M., and Dooley, S. (2007). IFN- $\gamma$  abrogates profibrogenic TGF- $\beta$  signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *Journal of Hepatology*, 46(2), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.09.014>
- WHO. (2018). *Web Annex 1. Decision-making table, PICO question on when to treat In: Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- WHO. (2021). Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections 2019. Accountability for the global health sector strategies. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>
- Woodhouse, S. D., Narayan, R., Latham, S., Lee, S., Antrobus, R., Gangadharan, B., Luo, S., Schroth, G. P., Klenerman, P., and Zitzmann, N. (2010). Transcriptome sequencing, microarray, and proteomic analyses reveal cellular and metabolic impact of hepatitis C virus infection in vitro. *Hepatology*, 52(2), 443–453. <https://doi.org/10.1002/hep.23733>
- World Health Organization. (2017). Global status report on blood safety and availability. Geneva: World Health Organization, 166. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254987/9789241565431-eng.pdf?sequence=1>
- World Health Organization. (2024). *Global hepatitis report 2024 Action for access in low-*

*and middle-income countries*. World Health Organization. <https://iris.who.int/>.

- Xie, Z., Bailey, A., Kuleshov, M. V., Clarke, D. J. B., Evangelista, J. E., Jenkins, S. L., Lachmann, A., Wojciechowicz, M. L., Kropiwnicki, E., Jagodnik, K. M., Jeon, M., and Ma'ayan, A. (2021). Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Current Protocols*, *1*(3), e90. <https://doi.org/10.1002/cpz1.90>
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. J. Y., Kalchauer, C., ... Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
- Yang, M. H., Chen, C. L., Chau, G. Y., Chiou, S. H., Su, C. W., Chou, T. Y., Peng, W. L., and Wu, J. C. (2009). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *50*(5), 1464–1474. <https://doi.org/10.1002/hep.23221>
- Zeisberg, M., and Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1429–1437.
- Zhang, G., Kernan, K. A., Collins, S. J., Cai, X., López-Guisa, J. M., Degen, J. L., Shvil, Y., and Eddy, A. A. (2007). Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: Role of plasmin-activated signals. *Journal of the American Society of Nephrology*, *18*(3), 846–859. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006080886>
- Zhang, L. J., Zheng, W. Da, Chen, Y. X., Huang, Y. H., Chen, Z. X., Zhang, S. J., Shi, M. N., and Wang, X. Z. (2007). Antifibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis. *Hepato-Gastroenterology*, *54*(79), 2092–2098.
- Zhang, Y. Q., Wan, L. Y., He, X. M., Ni, Y. R., Wang, C., Liu, C. B., and Wu, J. F. (2017).

Gremlin1 Accelerates Hepatic Stellate Cell Activation Through Upregulation of TGF-Beta Expression. *DNA and Cell Biology*, 36(7), 603–610. <https://doi.org/10.1089/dna.2017.3707>

Zhong, W., Uss, A. S., Ferrari, E., Lau, J. Y. N., and Hong, Z. (2000). De Novo Initiation of RNA Synthesis by Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5B Polymerase. *Journal of Virology*, 74(4), 2017–2022. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.4.2017-2022.2000>

Zhou, J. J., Meng, Z., He, X. Y., Cheng, D., Ye, H. L., Deng, X. G., and Chen, R. F. (2017). Hepatitis C virus core protein increases Snail expression and induces epithelial–mesenchymal transition through the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in hepatoma cells. *Hepatology Research*, 47(6), 574–583. <https://doi.org/10.1111/hepr.12771>

## 12.ANEXOS

En esa sección se especifica el equipo y los materiales utilizados durante todo el proyecto y la preparación de reactivos para la realización de cada uno de los protocolos mencionados anteriormente en la sección de metodología.

a. Equipo:

- Vórtex Genie 2
- Thermomixer (Eppendorf)
- Centrífuga refrigerada Biofuge primor (Heraeus)
- Nanodrop 2000 (ThermoScientific)
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder. Power Pac1000 (Bio-Rad)
- Microondas
- Campana de flujo laminar clase II tipo A2 (Nuair)
- Incubadora con tanque de CO<sub>2</sub> (Nuair)
- Centrífuga (cultivo)
- Bomba de vacío
- Microscopio óptico invertido (Olympus CKX41)
- Lector de microplacas GloMax®-Multimode Reader. (Promega)
- Ultracongeladores (Telstar)
- Congeladores
- Termociclador GeneAmp PCR system9700 (Applied Biosystems)
- Centrífuga Centrifuge 54150 (Eppendorf)
- Centrífuga IECL30R (Thermo electron corporation)
- Plancha con agitación (CIMAREC)
- Termociclador para PCR en tiempo real Step One Plus (AppliedBiosystems)
- ChemiDoc™ (Bio-Rad)
- Cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN (Bio-rad)
- Agitador mecánico (LabGenius)

b. Materiales:

- Micropipetas automáticas de volumen variable
- Puntillas para micropipetas
- Tubos cónicos eppendorf
- Gradillas
- Cama neubauer
- Frascos y placas de cultivo celular (Corning)
- Tubos falcón de 15 y 50mL
- Pipetas serológicas
- Placas de 96 pozos blancas de fondo plano (Corning)
- Pipetores electronicos
- Canaletas
- Tira de 8 tubos eppendorf MicroAmp (Applied Biosystems)
- Tapas ópticas para tubos MicroAmp (Applied Biosystems)
- Kimwipes (Kimtech Science)
- Raspador de goma (Nest)
- Agitador magnético
- Congelantes
- Membranas PVDF
- Papel filtro (Bio-Rad)
- Esponjas (Bio-Rad)
- Vidrios para electroforesis (Bio-Rad)
- Peine para formación de pozos (Bio-Rad)
- Pissetas
- Pinzas
- Placas de co-cultivo transwell (Thermo Scientific)
- Jeringa y Aguja de 0.8mm



c. Preparación de soluciones

Solución de lisis alcalina I

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Glucosa 1M	5 mL
Tris-HCl 1M pH 8	2.5 mL
EDTA 0.5M	1 mL
Agua miliQ	90.5 mL

Solución de lisis alcalina II

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
NaOH 0.2N	200 $\mu$ L
SDS 1%	1 mL
Agua miliQ	8.8 mL

Solución de lisis alcalina III

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Acetato de Potasio 5M	60 mL
Ácido acético	11.5 mL
Agua miliQ	28.5 mL

PBS 10X

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4 g

Ajustar a pH 7.4 con HCl y aforar a 1 L con agua MiliQ. Esterilizar solución

Buffer de lisis PKR 5X

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Tris base	15.14 g
Glicina	94 g
SDS	5 g

Aforar a 1 L con agua miliQ

Buffer de lisis PKR 1X

Reactivo	Volumen
Buffer de lisis PKR 5X	200 $\mu$ L
DTT 0.1 M	2 $\mu$ L
PMSF 0.0871 g/mL	2 $\mu$ L
Inhibidor de proteasas "Complete"	40 $\mu$ L
Agua miliQ	756 $\mu$ L

Geles de poliacrilamida con SDS

Gel separador al 12%

Reactivo	Volumen
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	4 mL
Tris-HCl pH 8.8 1.5 M	3.3 mL
SDS 10%	100 $\mu$ L
Agua miliQ	2.5 mL
Persulfato de amonio 70%	100 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L

Gel concentrador al 5%

Reactivo	Volumen
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	312 $\mu$ L
Tris-HCl pH 6.8 0.5 M	850 $\mu$ L
SDS 10%	25 $\mu$ L
Agua miliQ	1.825 mL
Persulfato de amonio 70%	25 $\mu$ L
TEMED	15 $\mu$ L

Buffer de carga 4X

Reactivo	Volumen
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10%	1.6 mL
Azul de bromofenol 1%	400 $\mu$ L
Beta Mercaptoetanol	400 $\mu$ L
Agua miliQ	3.3 mL

Buffer de corrida 5X

Reactivo	Cantidad
Tris base	15.14 g
Glicina	94 g

SDS	5 g
-----	-----

Aforar a 1 L con agua miliQ

Buffer de corrida 1X

Reactivo	Volumen
Buffer de corrida 5X	200 mL
Agua miliQ	800 mL

Buffer de transferencia 10X

Reactivo	Cantidad
Tris base	30.28 g
Glicina	14.41 g

Aforar a 0.5 L con agua miliQ

Buffer de transferencia 1X con metanol

Reactivo	Volumen
Buffer de transferencia 10X	100 mL
Metanol	200 mL
Agua miliQ	700 mL

TBS 10X

Reactivo	Cantidad
Tris base	24.2 g
NaCl	80 g

Ajustar a pH 7.6 con HCl y aforar a 1 L con agua MiliQ

TBS-T 1X

Reactivo	Volumen
TBS 10X	100 mL
Tween 20	1 mL
Agua miliQ	900 mL

d. Protocolo de lisis alcalina

1. Resuspender 1mL de bacterias transformadas en tubo cónico.
2. Centrifugar a 2,000 g por 10 minutos a 4°C.
3. Remover caldo LB y dejar el precipitado de bacterias totalmente seco.
4. Resuspender el precipitado con 300 µL de la solución de lisis alcalina I (Anexos) y mezclar en vórtex.
5. Agregar 300 µL de solución de lisis alcalina II (Anexos), mezclar con 15 inversiones suaves, incubar 5 minutos.
6. Agregar 300 µL de solución de lisis alcalina III (Anexos), mezclar con 15 inversiones suaves, incubar 5 minutos en hielo.
7. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 1 volumen de isopropanol frío, mezclar con 15 inversiones e incubar en hielo durante 15 minutos.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por 30 minutos a 4°C.
10. Descartar el isopropanol y lavar con 1 mL de etanol al 70%.
11. Centrifugar a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
12. Decantar y secar el precipitado de ADN a temperatura ambiente durante 15 minutos aproximadamente.
13. Resuspender el ADN plasmídico en 50 µL de agua tratada con DEPC (Anexos), reposar 5 minutos y verificar su calidad y concentración con uno del Nanodrop 2000.

e. Protocolo de subcultivo celular

1. Se retira medio de cultivo por aspiración
2. Se lavan con PBS 1X (Anexos) y se retira por aspiración.
3. Se añade tripsina 1X 0.25% y se incuban 5 minutos para despegar las células
4. Se neutraliza la tripsina con 1 volumen de medio de cultivo suplementado.
5. Las células en suspensión se pasan a un tubo falcón y se centrifugan a 1,500 rpm por 5 minutos. Durante este tiempo se prepara el frasco o placas con medio de cultivo nuevo donde serán sub-cultivadas.
6. Una vez formado el pellet de células, se les retira el medio de cultivo y se resuspenden en 1 mL de medio de cultivo suplementado nuevo.
7. Se hace un conteo de las células con el uso de azul de tripán de la siguiente manera:
  - a. Se mezcla en un tubo, 60  $\mu$ L de medio de cultivo con 10  $\mu$ L de la resuspensión de células, y con 10  $\mu$ L de azul de tripán. (Dilución 1:8)
  - b. Se homogeniza muy bien y se depositan 10 $\mu$ L de la mezcla a la cámara de Neubauer.
  - c. Se realiza un conteo de las células vivas en los 4 cuadrantes de las esquinas y en el cuadrante central. Se saca un promedio y se sigue la siguiente fórmula:  $\text{Número de células/mL} = \text{promedio} \times \text{factor de dilución (8)} \times 10^4$
8. Una vez obtenido el número de células por mL en la resuspensión, se pasa la cantidad necesaria según se necesite en el frasco o placa donde se requieran sub-cultivar.
9. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta su uso.