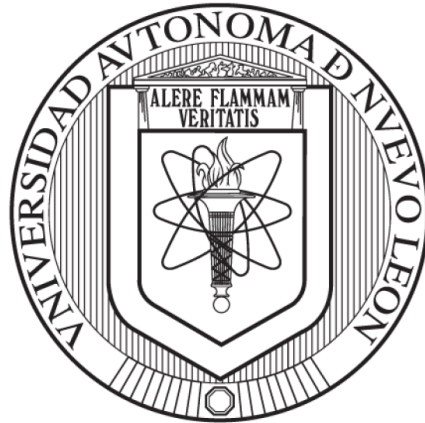


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**MODELO DE EXPRESIÓN TRANSITORIA DE LAS PROTEÍNAS NO
ESTRUCTURALES (NS2-NS5B) DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y SU EFECTO
SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HEPATOCITOS TUMORALES Y NO
TUMORALES**

POR

LBG. LESLIE VIANNEY ALFARO REYES

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

JUNIO, 2026

MODELO DE EXPRESIÓN TRANSITORIA DE LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES
(NS2-NS5B) DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y SU EFECTO SOBRE EL ESTRÉS
OXIDATIVO EN HEPATOCITOS TUMORALES Y NO TUMORALES

Comité de tesis



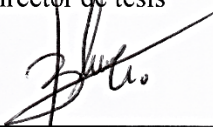
Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla

Directora de tesis



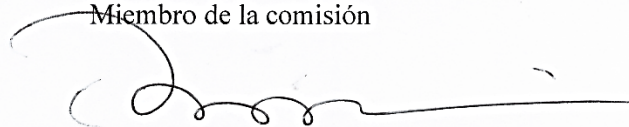
Dr. C. Daniel Arellanos Soto

Co-director de tesis



Dra. med. Blanca Esthela Alvarez Salas

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 (CIIViM) del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección de la Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Ana María Rivas**, por recibirme en su laboratorio, por brindarme las facilidades y el apoyo necesario para que pudiera cursar mi maestría. Agradezco que me haya retado día a día a ser mejor, a superarme y a desarrollar un pensamiento más crítico. Siempre le estaré agradecida por haber confiado en mí y en mi trabajo desde el primer momento.

A mi comisión de tesis, el **Dr. Daniel Arellanos** y la **Dra. Blanca Alvarez**. Por su tiempo, sus valiosos comentarios que fueron fundamentales para mi crecimiento académico y profesional y por apoyarme con cualquier cosa que estuviera en sus manos.

A la **Dra. Tania Heredia**, **Dra. Sonia Lozano** y **Dra. Verónica Alvarado**, por sus consejos tanto en el laboratorio como en la vida. Valoro que siempre hayan encontrado un momento, entre tantas ocupaciones, para escucharme, ayudarme a despejar dudas y miedos, y guiarme para que lograra un buen trabajo.

Al **M.C. Alí Ruíz**, porque cada plática y consejo me ayudó a ampliar mi perspectiva. Gracias por invitarme a exigirme y cuestionarme, pero también a encontrar el equilibrio para relajarme.

A mis compañeras de maestría, **Marcela Rivera** y **Fernanda Ramírez**, porque con su compañía todo fue más fácil y ameno. Marce, gracias por hacer de nuestra casa un refugio seguro después de los días más difíciles. Fer, gracias por brindarme una amistad incondicional. Las llevaré siempre en el corazón.

A mis compañeros de generación, particularmente **Carlita**, **Rolando**, **Oliver** y **Emilio**, por compartir este camino.

A mis compañeros de CIIViM, **Ilse**, **Cynthia**, **Jona**, **Caba** y **Jennifer**, por su calidez y por enseñarme gran parte de lo que sé hoy.

A mis amigos de bioquímica, **Robert** e **Itzel**, por ser una gran inspiración.

A mis amigas **Angie**, **Grecia** y **Ale**, por su autenticidad y por ser tan comprensivas con mis ausencias durante este proceso.

A mis hermanos **Gloria**, **Juan** y **Jacob**, por acompañarme siempre. Gracias por escucharme hablar y hablar sobre temas que, aunque quizá no compartían del todo, seguían con atención solo porque sabían cuánto me apasionan.

A **Maki** y **Miso**, por hacerme ver cuando ya era muy tarde y debíamos dormir, por acurrucarse cuando necesitaba compañía, y por ser los gatos más bellos del mundo.

A **José María Cuellar**, porque llegaste a la par que mis plásmidos y pensé que era el momento más caótico para conocerte, pero en realidad no pudo haber mejor momento que ese. Gracias por tu cariño, tu paciencia, y por compartirme un poco de tu vida.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (**SECIHTI**), por el apoyo económico brindado para la realización y manutención de mis estudios de posgrado.

DEDICATORIA

Para mi mami.

Espero algún día ser la mitad de fuerte de lo que tú eres.

Para mí.

*Porque esta etapa me llevó por un camino hacia conocerme, a aprender a ser más amable
conmigo, y a no perseguirme tanto.*

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE GRÁFICOS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
1. RESUMEN.....	Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT.....	Error! Bookmark not defined.
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Hepatitis C	4
3.1.1. Historia natural de la enfermedad	5
3.2. Epidemiología de la hepatitis C	7
3.3. Vías de transmisión	9
3.4. Agente etiológico.....	10
3.4.1. Organización genómica del VHC	10
3.4.2. Ciclo replicativo en células hepáticas.....	13
3.4.3. VHC y estrés oxidativo	14
3.4.4. VHC y sistemas antioxidantes.....	17
3.4.5. Consecuencias patofisiológicas del desbalance redox	18
3.5. Diagnóstico y tratamiento	20
3.6. Riesgo de CHC residual y desafíos globales	21
3.7. Modelos experimentales <i>in vivo</i> para estudiar el VHC.....	22
3.8. Modelos experimentales <i>in vitro</i> para estudiar el VHC.....	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVOS.....	26
6.1. Objetivo general.....	26
6.2. Objetivos específicos	26
7. METODOLOGÍA.....	27
7.1. Estrategia experimental general.....	27
7.2. Diseño del vector de expresión de proteínas no estructurales del VHC.....	28
7.2.1. Caracterización del vector	28
7.3. Subcultivos celulares.....	29
7.4. Transfección transitoria de los plásmidos en células THLE-2 y Huh-7.....	30

7.5. Ensayos de viabilidad y citotoxicidad	31
7.5.1. Ensayo de viabilidad metabólica	31
7.5.2. Ensayo de citotoxicidad	32
7.6. Extracción de RNA total	32
7.7. Evaluación de la expresión génica mediante RT-qPCR	33
7.8. Cálculo de número de copias del transcrito de VHC	35
7.9. Extracción de proteínas totales	36
7.10. Cuantificación de proteínas totales por método de Bradford	37
7.11. Evaluación de la expresión proteica mediante la actividad de NanoLuc	38
7.12. Evaluación de la expresión proteica mediante Western blot	38
7.12.1. SDS-PAGE	39
7.12.2. Transferencia a membrana PVDF	39
7.12.3. Inmunodetección	40
7.12.4. Análisis densitométrico	41
7.13. Evaluación integral del estrés oxidativo	41
7.13.1. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno mediante DCFH-DA	41
7.13.2. Cuantificación de superóxido mitocondrial mediante ensayo de MitoSOX	42
7.14. Análisis estadístico	43
8. RESULTADOS	44
8.1. Diseño y caracterización de los plásmidos	44
8.2. Transfección y su efecto en la viabilidad metabólica	47
8.3. Transfección y su efecto en la citotoxicidad celular	48
8.4. Expresión del constructo pHCV-T2A-NL a nivel transcripcional y traduccional	49
8.5. Caracterización funcional del estrés oxidativo inducido por pHCV-T2A-NL	54
8. DISCUSIÓN	60
9. CONCLUSIONES	68
10. PERSPECTIVAS	69
11. REFERENCIAS	70
12. ANEXOS	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla para la caracterización de plásmidos mediante cortes con enzimas de restricción.	29
Tabla 2. Reactivos para la transfección transitoria mediante lipofección.	30
Tabla 3. Reactivos y condiciones para la retrotranscripción del ARN.	34
Tabla 4. Reactivos para la qPCR a partir del ADNc.	34
Tabla 5. Condiciones para la qPCR.	35
Tabla 6. Datos de los estándares para el cálculo de número de copias.	36
Tabla 7. Cantidades empleadas para la preparación de los estándares de la curva de cuantificación.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curso temporal de progresión en la infección crónica por hepatitis C	6
Figura 2. Prevalencia global por regiones reportadas por la OMS en 2022.....	9
Figura 3. Representación esquemática del genoma y las proteínas del VHC.....	12
Figura 4. Mecanismo de entrada del virus de la hepatitis C.....	14
Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos de estrés celular y alteración metabólica inducidos por las proteínas del VHC.....	16
Figura 6. Estrategia experimental general del proyecto.	27
Figura 7. Mapas esquemáticos de los plásmidos diseñados.	45
Figura 8. Caracterización del plásmido pHCV-T2A-NL y pNluc por electroforesis en gel de agarosa al 1%.	46
Figura 9. Detección cualitativa de las proteínas virales en los extremos de la poliproteína (NS2 y NS5B) en células Huh-7 a las 72 h post-transfección.	54
Figura 10. Evaluación de superóxido mitocondrial mediante fluorescencia de MitoSOX en células Huh-7 a las 72 h post-transfección con pHCV-T2A-NL.	58

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Viabilidad celular evaluada mediante ensayo CellTiter en células Huh-7 (a) y THLE-2 (b) a las 72 h post-transfección.	47
Gráfico 2. Citotoxicidad evaluada mediante ensayo CytoTox-Glo en células Huh-7 (a) y THLE-2 (b) a las 72 h post-transfección.	48
Gráfico 3. Curva estándar del plásmido pHCV-T2A-NL.	49
Gráfico 4. Expresión transcripcional de pHCV en células Huh-7 a las 72 h post-transfección, evaluada mediante el cálculo de No. de copias por RT-qPCR.	50
Gráfico 5. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford.	51
Gráfico 6. Actividad de NanoLuc normalizada por µg de proteína total en células Huh-7 (a) y THLE-2 (b) a las 72 h post-transfección.	51
Gráfico 7. Expresión traduccional de las proteínas no estructurales NS3 y NS5A del VHC en células Huh-7 a las 72 h post-transfección, evaluada mediante Western Blot.	52
Gráfico 8. Expresión traduccional de las proteínas no estructurales NS3 y NS5A del VHC en células THLE-2 a las 72 h post-transfección, evaluada mediante Western Blot.	53
Gráfico 9. Expresión relativa de genes relacionados a estrés oxidativo en células Huh-7 a las 72 h post-transfección, evaluada mediante RT-qPCR.	55
Gráfico 10. Determinación de ROS totales mediante fluorescencia de DCF en células Huh-7 a las 72 h post-transfección con pHCV.	56
Gráfico 11. Determinación de superóxido mitocondrial mediante fluorescencia de MitoSOX en células Huh-7 a las 72 h post-transfección con pHCV.	59

LISTA DE ABREVIATURAS


°C	Grados Celsius
aa	Aminoácidos
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADMEM	<i>Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína cinasa B
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATF6	Factor de transcripción activador 6
ATG3	Proteína relacionada con la autofagia 3
ATM	Gen mutado en ataxia telangiectasia
BBC3 / PUMA	Modulador de apoptosis regulado al alza por p53
Bcl-xL	Proteína de linfoma de células B extragrande
BEBM	Medio basal para células epiteliales bronquiales
BiP / GRP78	Proteína de unión a inmunoglobulina / Proteína regulada por glucosa de 78 kDa
BSA	Albúmina sérica bovina
c.b.p.	Cuanto baste para
CD81	Clúster de diferenciación 81
CHC	Carcinoma hepatocelular
CHOP	Proteína homóloga a C/EBP (DDIT3) / Proteína inducible por daño en el ADN 153
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Ciclo umbral
Cu	Cobre
DAAs	Antivirales de acción directa
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EF1 α	Factor de elongación 1 alfa
eIF2 α	Factor de iniciación de la traducción eucariota 2 alfa
EIF2AK3	Cinasa 3 del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 alfa
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EOR	Respuesta a la sobrecarga del retículo endoplásmico
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FASN	Ácido graso sintasa
SFB	Suero fetal bovino
FW	<i>Forward</i>
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPX1	Glutación peroxidasa 1
h	Horas
HBSS	Solución salina equilibrada de Hank

HCV	Virus de la hepatitis C
hEGF	Factor de crecimiento epidermal humano
HK2	Hexocinasa 2
Hsp90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IL-12	Interleucina 12
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
JAK	Cinasa Janus
JFH-1	Cepa del virus de la hepatitis C (genotipo 2a)
JNK	Cinasa N-terminal de c-Jun
kb	Kilobases
Keap1	Proteína asociada a ECH similar a Kelch 1
LB	Caldo Luria-Bertani
LDL-R	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
mA	Miliamperios
MAPK	Cinasa activada por mitógenos
Mcl-1	Célula de leucemia mieloide 1
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MMLV	Virus de la Leucemia Murina de Moloney
Mn	Manganeso
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducido
NanoLuc	Nano luciferasa
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NOX	NADPH oxidasa
NRF2	Factor nuclear derivado del eritroide 2 relacionado con el factor 2
NTPasa	Nucleósido trifosfatasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina amortiguada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHH	Hepatocitos primarios humanos
PI3K	Fosfoinositida 3-cinasa
PKM	Piruvato cinasa muscular
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PTEN	Fosfatasa y homólogo de tensina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RAS	Proteínas relacionadas con retrovirus de sarcoma de rata
RE	Retículo endoplásmico
RLU	Unidades relativas de luz
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa
RV	<i>Reverse</i>
RVS	Respuesta virológica sostenida
rxn	Reacción
SCID/Alb-uPA	Ratones con inmunodeficia combinada severa con transgén del activador del plasminógeno tipo urocinasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sMaf	Proteínas pequeñas Maf
SOD	Superóxido dismutasa
SR-BI	Receptor de clase B tipo I
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción
SV40	Virus simio 40
T3	Triyodotironina
TBS-T	Solución salina amortiguada con Tris y Tween 20
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TP53	Gen supresor de tumores p53
U	Unidades
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
UTR	Región no traducida
V	Voltios
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
x g	Fuerza centrífuga relativa (gravedades)
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrómetros

1. RESUMEN

Introducción y objetivo. La infección crónica causada por el virus de la hepatitis C (VHC) continúa siendo, a nivel mundial, una causa importante de enfermedad hepática avanzada, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular. El estudio de su patogénesis ha sido limitado por la dificultad de replicación *in vitro* y el uso predominante de modelos de hepatocarcinoma, los cuales no reflejan la fisiología hepática normal. Por ello, resulta fundamental el desarrollo de modelos basados en líneas celulares no tumorales. **Objetivo:** Establecer y caracterizar un modelo celular de expresión transitoria de las proteínas no estructurales del VHC (NS2-NS5B) en células hepáticas tumorales y no tumorales para evaluar su efecto sobre el estrés oxidativo. **Material y métodos.** Células de hepatocarcinoma Huh-7 y hepatocitos no tumorales THLE-2 fueron transfectadas con diferentes dosis (0.5 y 1.0 μg) del plásmido pHCV-T2A-NL que codifica las proteínas NS2-NS5B, durante 72 horas. Se evaluó el efecto de la transfección en la viabilidad metabólica celular y la citotoxicidad celular relativa. La expresión transcripcional del VHC, así como de genes de respuesta a estrés oxidativo SOD1, SOD2, NRF2, CHOP se analizó por RT-qPCR, mientras que la expresión traduccional del reportero NanoLuc y de las proteínas virales NS2, NS3, NS5A y NS5B se evaluó mediante ensayos de luminiscencia y Western blot, respectivamente. Asimismo, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) totales y la acumulación de superóxido mitocondrial en el modelo de referencia Huh-7 se determinaron mediante el uso de las sondas fluorescentes DCFH-DA y MitoSOX, respectivamente. **Resultados.** La viabilidad celular disminuyó de forma dosis-dependiente; las células Huh-7 se mantuvieron por encima del umbral del 70%, mientras que las THLE-2 mostraron una mayor sensibilidad, reduciendo su viabilidad por debajo del 70% con la dosis de 1.0 μg . A nivel transcripcional, se confirmó la expresión de NS5A (de 1×10^4 a 1×10^5 copias/ng de ARN) indicando que el plásmido pHCV-T2A-NL es transcrito de manera robusta y dosis-dependiente. Se registró una actividad luminiscente significativa en ambas líneas (1×10^6 RLU/ μg en Huh-7 y 1×10^5 RLU/ μg en THLE-2). El Western blot confirmó la traducción y el correcto procesamiento de las proteínas NS2, NS3, NS5A y NS5B, mostrando una dependencia con la dosis y una abundancia relativa diferencial dependiente de la línea celular. La expresión viral indujo un incremento significativo y dosis-dependiente de ROS totales a las 72 horas (165% con 0.5 μg y 200% con 1.0 μg), así como un aumento estadísticamente significativo en el superóxido mitocondrial con la dosis máxima ($p < 0.0001$). En contraste, la expresión de los genes antioxidantes SOD1, SOD2 y NRF2 no reveló cambios significativos frente al vector vacío. **Conclusiones.** Se estableció con éxito un modelo de expresión transitoria para las proteínas NS2-NS5B en las líneas Huh-7 y THLE-2, corroborando su actividad transcripcional y traduccional. Se determinó una susceptibilidad diferencial en la viabilidad, siendo los hepatocitos no tumorales THLE-2 más sensibles a la expresión del constructo. La expresión de las proteínas virales indujo un estado de estrés oxidativo característico, mediante la acumulación mitocondrial de ROS a las 72 horas. Sin embargo, este incremento no desencadenó una respuesta antioxidante compensatoria en el modelo, evidenciado por la falta de inducción en los genes NRF2, SOD1, SOD2 y CHOP. El empleo de este modelo constituye una estrategia potencialmente útil para estudiar alteraciones en las funciones celulares que no se han dilucidado en los modelos celulares actuales.


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

ABSTRACT

Background. Chronic infection caused by the hepatitis C virus (HCV) remains a major cause of advanced liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma worldwide. The study of its pathogenesis has been limited by the difficulty of *in vitro* replication and the predominant use of hepatocarcinoma models, which do not reflect normal hepatic physiology. Therefore, the development of models based on non-tumor cell lines is fundamental. **Aim:** To establish and characterize a cellular model for the transient expression of HCV non-structural proteins (NS2-NS5B) in tumor and non-tumor liver cells to evaluate their effect on oxidative stress. **Methods.** Huh-7 hepatocarcinoma cells and THLE-2 non-tumor hepatocytes were transfected with different doses (0.5 and 1.0 μg) of the pHCV-T2A-NL plasmid encoding the NS2-NS5B proteins for 72 hours. The effect of transfection on cellular metabolic viability and relative cellular cytotoxicity was evaluated. The transcript levels of HCV, as well as oxidative stress response genes SOD1, SOD2, NRF2, and CHOP, was analyzed by RT-qPCR, while the protein expression of the NanoLuc reporter and viral proteins NS2, NS3, NS5A, and NS5B was evaluated using luminescence assays and Western blot, respectively. Furthermore, the generation of total reactive oxygen species (ROS) and the accumulation of mitochondrial superoxide in the Huh-7 reference model were determined using DCFH-DA and MitoSOX fluorescent probes, respectively. **Results.** Cell viability decreased in a dose-dependent manner; Huh-7 cells remained above the 70% threshold, while THLE-2 cells showed greater sensitivity, reducing their viability below 70% at the 1.0 μg dose. At the transcriptional level, NS5A expression was confirmed (from 1×10^4 to 1×10^5 copies/ng of RNA), indicating that the pHCV-T2A-NL plasmid is transcribed robustly and in a dose-dependent manner. Significant luminescent activity was recorded in both lines (1×10^6 RLU/ μg in Huh-7 and 1×10^5 RLU/ μg in THLE-2). Western blot confirmed the translation and proper processing of the NS2, NS3, NS5A, and NS5B proteins, showing dose-dependence and a differential relative abundance dependent on the cell line. Viral expression induced a significant, dose-dependent increase in total ROS at 72 hours (165% with 0.5 μg and 200% with 1.0 μg), as well as a statistically significant increase in mitochondrial superoxide at the maximum dose ($p < 0.0001$). In contrast, the expression of antioxidant genes SOD1, SOD2, and NRF2 did not reveal significant changes compared to the empty vector. **Conclusions.** A transient expression model for NS2-NS5B proteins was successfully established in Huh-7 and THLE-2 cell lines, confirming their transcriptional and translational activity. A differential susceptibility in viability was determined, with THLE-2 non-tumor hepatocytes being more sensitive to the expression of the construct. The expression of viral proteins induced a characteristic state of oxidative stress through the mitochondrial accumulation of ROS at 72 hours. However, this increase did not trigger a compensatory antioxidant response in the model, as evidenced by the lack of induction in the NRF2, SOD1, SOD2, and CHOP genes. The use of this model constitutes a potentially useful strategy to study alterations in cellular functions that remain unelucidated in existing cell-based models.



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

2. INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa provocada por el virus de la hepatitis C (VHC), un patógeno hepatótrofo de la familia *Flaviviridae*. Identificado en 1989 tras ser conocido como "hepatitis no-A no-B", su descubrimiento marcó un hito en la virología moderna al ser el primer virus humano detectado mediante técnicas de biología molecular sin aislamiento previo. Hoy en día, representa un desafío de salud pública, puesto que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen cerca de 50 millones de personas con infección crónica a nivel global.

La transmisión del VHC ocurre principalmente por el contacto directo con sangre contaminada, a menudo vinculado al uso de drogas intravenosas o a prácticas médicas inseguras. Una vez en el organismo, el virus destaca por su capacidad para evadir la respuesta inmune; entre el 55% y el 85% de los pacientes desarrollan una infección crónica. Esta persistencia se traduce en una inflamación hepática continua y en un severo desequilibrio redox intracelular que eleva las especies reactivas de oxígeno (ROS). Este estrés celular sostenido impulsa la activación de células estrelladas y la acumulación de colágeno, originando una fibrosis progresiva que puede culminar en cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). Incluso tras la eliminación del virus, los cambios epigenéticos inducidos pueden mantener latente el riesgo de progresión maligna.

Pese a los avances terapéuticos existentes en cuanto al tratamiento con antivirales de acción directa (DAAs), la investigación básica del VHC sigue enfrentando barreras importantes. La ausencia de modelos animales accesibles y la baja eficiencia de replicación viral *in vitro* han limitado su estudio experimental. Para superar este obstáculo, las investigaciones se han apoyado de líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma, sin embargo, estas presentan alteraciones moleculares y metabólicas derivadas de su origen tumoral. En este contexto, resulta crucial evaluar la respuesta diferencial frente a la expresión de proteínas virales utilizando modelos celulares no tumorales, lo que representa una estrategia fundamental para dilucidar los mecanismos patogénicos tempranos y de adaptación celular que impulsan la progresión del daño hepático.

3. ANTECEDENTES

3.1. Hepatitis C

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa caracterizada por la inflamación del hígado. Es causada por el VHC, un virus hepatótrofo perteneciente a la familia *Flaviviridae*, siendo un importante contribuyente a las enfermedades hepáticas crónicas a nivel mundial (Choo et al., 1989; Mosley et al., 1990; Puchades y Berenguer, 2018).

Históricamente, se creía que la hepatitis viral consistía únicamente en dos tipos: la hepatitis infecciosa (tipo A) y la hepatitis sérica (tipo B). Estas patologías se distinguían clínicamente por sus circunstancias de exposición y periodos de incubación; la hepatitis A se caracteriza por una ruta fecal-oral y una incubación corta, mientras que la hepatitis B se asocia a la exposición percutánea a sangre y un periodo de incubación largo. Con el incremento de casos asociados a transfusiones sanguíneas, el descubrimiento del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en 1963 cimentó el camino para el tamizaje de sangre. Aunque la exclusión de donadores infecciosos ayudó a disminuir los casos de hepatitis postransfusional entre un 25% y un 50%, siguieron apareciendo casos que lograban evadir este tamizaje (Blumberg y Riddell, 1963).

En 1975, Feinstone reconoció la enfermedad causante de los casos restantes como "hepatitis no-A, no-B" (Feinstone, et al. 1975). Los estudios de las transfusiones identificaron que esta enfermedad producía una "hepatitis aguda" cuyo periodo de incubación se situaba entre el de la hepatitis A y el de la hepatitis B. Estudios posteriores de transmisión en chimpancés demostraron el desarrollo de alteraciones bioquímicas similares en estos animales, confirmando que la hepatitis no-A, no-B era el resultado de un agente transmisible, el cual probablemente era un agente pequeño con envoltura (Alter et al., 1989; Choo et al., 1989).

A pesar de que se sabía de su existencia, la causa exacta de la afección fue identificada hasta 1989. El descubrimiento del VHC marcó un hito en la virología moderna al ser el primer virus humano detectado mediante técnicas de biología molecular sin necesidad de aislamiento previo. Este hallazgo permitió el desarrollo de pruebas de diagnóstico que finalmente lograron erradicar el VHC del suministro de transfusiones de sangre. Pruebas retrospectivas en sueros almacenados tanto de donadores como de receptores confirmaron que la hepatitis no-A, no-B y el VHC eran lo mismo. Durante los siguientes 25 años, a pesar del reto que representaba la incapacidad de cultivar

los virus de pacientes en el laboratorio, se lograron avances para comprender la heterogeneidad genética del VHC, su ciclo de vida y el desarrollo de sistemas experimentales de cultivo celular (Houghton, 2019; Manns & Maasoumy, 2022; Choo et al., 1989; Mosley et al., 1990).

3.1.1. Historia natural de la enfermedad

La historia natural de la infección por el VHC se caracteriza por una progresión lenta, pero continua, que suele desarrollarse a lo largo de dos a cuatro décadas (**Figura 1**). Esta evolución es el resultado directo de la interacción entre el virus, la respuesta inmunológica del hospedero y diversos factores de riesgo ambientales y genéticos.

Durante la fase aguda, que ocurre en las primeras semanas o meses posteriores al contagio, la mayoría de los pacientes cursa de forma asintomática o con síntomas inespecíficos como fatiga, malestar general o elevación moderada de transaminasas. Se estima que entre el 15% y el 25% de los individuos logran la resolución virológica espontánea mediante una respuesta inmune efectiva. Sin embargo, la probabilidad de eliminación espontánea está fuertemente influenciada por la edad y el sexo al momento de la infección; por ejemplo, infantes y mujeres jóvenes alcanzan tasas de resolución de hasta un 42% a 45%. En contraste, en el 75% al 85% de los pacientes, el VHC consigue evadir la respuesta inmunológica, estableciendo una infección persistente (Abdelmuktader, 2019). En esta fase crónica, se instauran respuestas celulares de estrés en el hígado que incluyen la detención del ciclo celular, apoptosis, estrés del retículo endoplásmico y activación de la autofagia, eventos que contribuyen de manera progresiva al deterioro estructural y funcional del órgano. Estos mecanismos celulares, junto con alteraciones metabólicas como la acumulación de lípidos, la esteatosis y la resistencia a la insulina, se consolidan como rasgos típicos de la evolución natural de la infección (Vescovo et al., 2016). A medida que la infección persiste, se desarrolla un estado de inflamación hepática sostenida. El reclutamiento continuo de linfocitos T citotóxicos, células NK y macrófagos promueve la secreción prolongada de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno, lo cual genera daño oxidativo, disfunción mitocondrial y peroxidación lipídica en el hepatocito (Karimi-Sari et al., 2024). Esta inflamación crónica constituye un paso clave, pues impulsa la activación de las células estrelladas hepáticas, las cuales transitan hacia un fenotipo miofibroblástico responsable de la deposición de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Con el paso del tiempo, este proceso de remodelación

tisular culmina en fibrosis progresiva, que en población adulta con factores de riesgo la incidencia puede ser de un 15%, la cual avanza desde grados iniciales hasta una cirrosis establecida, transitando de una fase compensada a una descompensada. Una vez presente la cirrosis, el riesgo de evolución hacia CHC alcanza entre el 1% y el 3% tras 30 años de evolución de la enfermedad (Ružić, et al. 2018).

Cada vez son más los estudios que muestran que incluso cuando los pacientes logran una respuesta virológica sostenida tras el tratamiento con DAA, el riesgo de CHC disminuye sustancialmente, pero no se elimina. La incidencia anual de CHC en pacientes curados con cirrosis subyacente ronda entre el 1.39% y 2.9% (El-Serag et al., 2016; Shiha et al., 2020). Se ha sugerido que las modificaciones epigenéticas inducidas por el VHC durante la infección crónica, como la metilación del ADN y los cambios en las histonas, persisten tras la eliminación viral y podrían estar contribuyendo al riesgo de transformación maligna (Zhao et al., 2021).

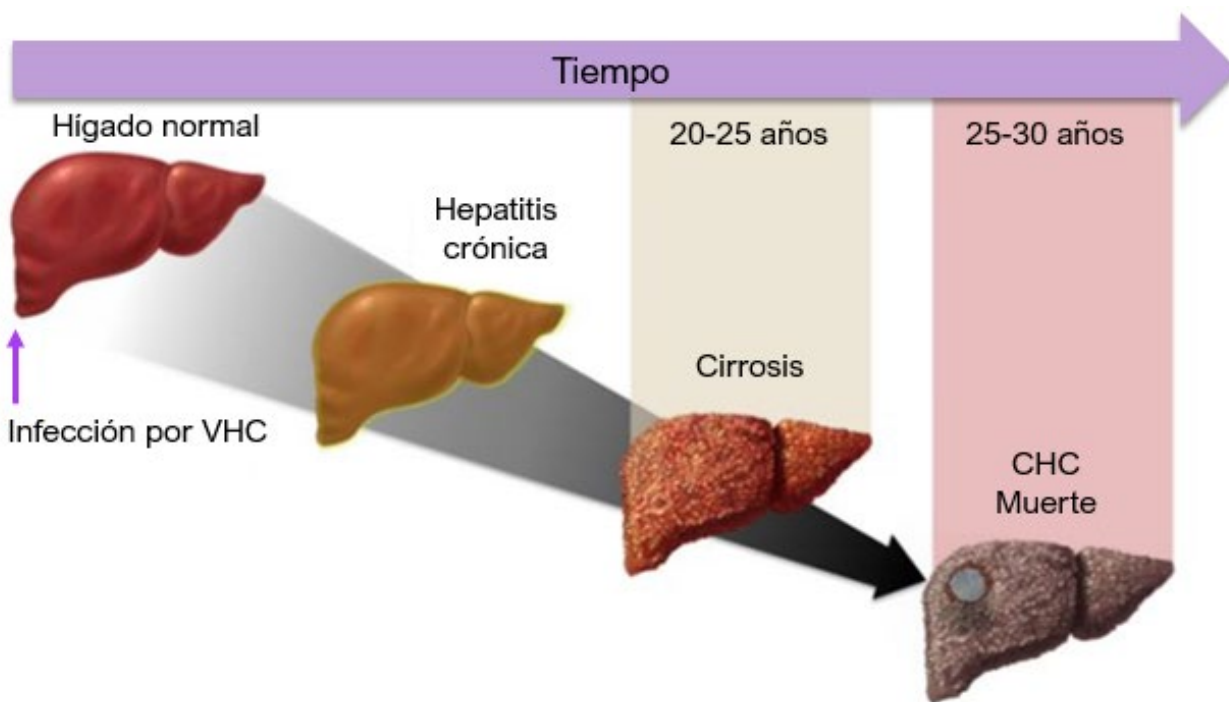


Figura 1. Curso temporal de progresión en la infección crónica por hepatitis C. Tras la infección inicial, la patología suele evolucionar hacia una hepatitis crónica. En ausencia de resolución o tratamiento, el daño hepático continuo conlleva al desarrollo de cirrosis en un periodo de 20 a 25 años, con el riesgo subsecuente de progresar a CHC y la muerte entre los 25 y 30 años posinfección. (Modificado de Hepatitis C Online, 2024).

3.2. Epidemiología de la hepatitis C

La infección por el virus de la hepatitis C es un problema de salud pública de distribución mundial. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2023 había aproximadamente 50 millones de personas viviendo con infección crónica por el VHC, con alrededor de un millón de nuevas infecciones cada año (Sallam & Khalil, 2024; World Health Organization, 2024). La distribución de esta carga a nivel global es heterogénea; la mayor cantidad de casos se concentra en la Región del Mediterráneo Oriental, con 12 millones de personas infectadas crónicamente, a esta le siguen la Región de Asia Sudoriental y la Región Europea con 9 millones cada una, la Región de África con 8 millones, la Región del Pacífico Occidental con 7 millones y, finalmente, la Región de las Américas con 5 millones de personas afectadas. (**Figura 2**) (World Health Organization, 2024).

En cuanto a la prevalencia poblacional general, reportes de la OMS llegaron a estimar que más del 3% de la población mundial estaba infectada. Sin embargo, estudios epidemiológicos independientes basados en el análisis de 98 investigaciones con una muestra conjunta de más de 236,000 personas sitúan la prevalencia global actual del VHC en un 1.8%. A nivel continental, existen disparidades geográficas importantes, destacando el continente africano con la prevalencia más alta, alcanzando un 7.1%. (Salari, et al. 2022).

Además de la geografía, la prevalencia se ve influenciada por la presencia de comorbilidades infecciosas. Un grupo particularmente vulnerable es el de las personas que viven con virus de inmunodeficiencia humana (VIH); a nivel global, alrededor de 2.3 millones de los 39 millones de personas con VIH tienen evidencia serológica de infección pasada o presente por el VHC (Garg et al., 2014). En esta población, la enfermedad hepática crónica representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Esta alta vulnerabilidad radica en el elevado riesgo de coinfección, ya que ambos patógenos comparten las mismas rutas de propagación. A nivel general, se calcula que entre el 20 % y el 30 % de las personas con VIH están también infectadas con el VHC, aunque esta cifra se eleva hasta un 90 % en poblaciones con exposición percutánea directa, como los usuarios de drogas intravenosas (Hernandez & Sherman, 2011). Por otro lado, aunque el VHC se disemina con menor eficiencia por vía sexual que el VIH, la incidencia aumenta significativamente en grupos de alto riesgo con múltiples contactos sin protección (Gupta, 2013)(Van De Laar et al., 2007). De igual manera, el riesgo de transmisión de madre a hijo del

VHC se incrementa de forma notable cuando la gestante es VIH positiva (Operskalski & Kovacs, 2011). Desde una perspectiva clínica, la interacción de ambos virus agrava el pronóstico del paciente; el VIH incrementa la carga viral del VHC, exacerba las lesiones hepáticas y acelera rápidamente la progresión de la enfermedad (Porrás-Ramírez & Rico-Mendoza, 2020). Además, las personas coinfectadas muestran una menor capacidad para eliminar la infección aguda por VHC de manera espontánea, lo que favorece su cronicidad y su propagación (Shapatava et al., 2006).

Recientemente se ha identificado una dinámica epidemiológica emergente en hombres seronegativos al VIH que tienen sexo con hombres (HSH) y que utilizan profilaxis preexposición (PrEP). Debido a las conductas sexuales asociadas, esta población ha mostrado un incremento notable en el riesgo de infección por VHC. Se ha reportado una seroprevalencia inicial del 2.1 % en HSH seronegativos usuarios de PrEP y una incidencia que aumentó hasta alcanzar 4.0 nuevas infecciones por cada 100 personas por año en 2016. Esta alta incidencia demuestra que la transmisión sexual del VHC es un riesgo epidemiológico sustancial incluso en ausencia del VIH (Tabatabavakili et al., 2022).

El impacto clínico de estas cifras es considerable ya que se estima que en 2022 aproximadamente 242,000 personas murieron a nivel global por causas relacionadas con la hepatitis C, principalmente debido a cirrosis y carcinoma hepatocelular (World Health Organization, 2024). Particularmente en México se tiene una prevalencia general estimada del 0.4% al 0.6%, sin embargo, esta cifra se eleva significativamente en poblaciones de alto riesgo, como los usuarios de drogas inyectables, especialmente en regiones fronterizas del país. En el estado de Nuevo León, se ha observado un aumento significativo en los casos de hepatitis C durante 2024. Según datos de la Secretaría de Salud, los casos reportados de hepatitis C aumentaron un 93.47%, pasando de 92 casos en 2023 a 178 en 2024 (CENSIDA, 2025; Secretaría de Salud, 2024). Dada la considerable carga para la salud pública, la OMS ha establecido objetivos para reducir la incidencia y mortalidad asociadas al VHC, incluyendo la meta de tratar al 80% de las personas con hepatitis C crónica para 2030 (World Health Organization, 2024).

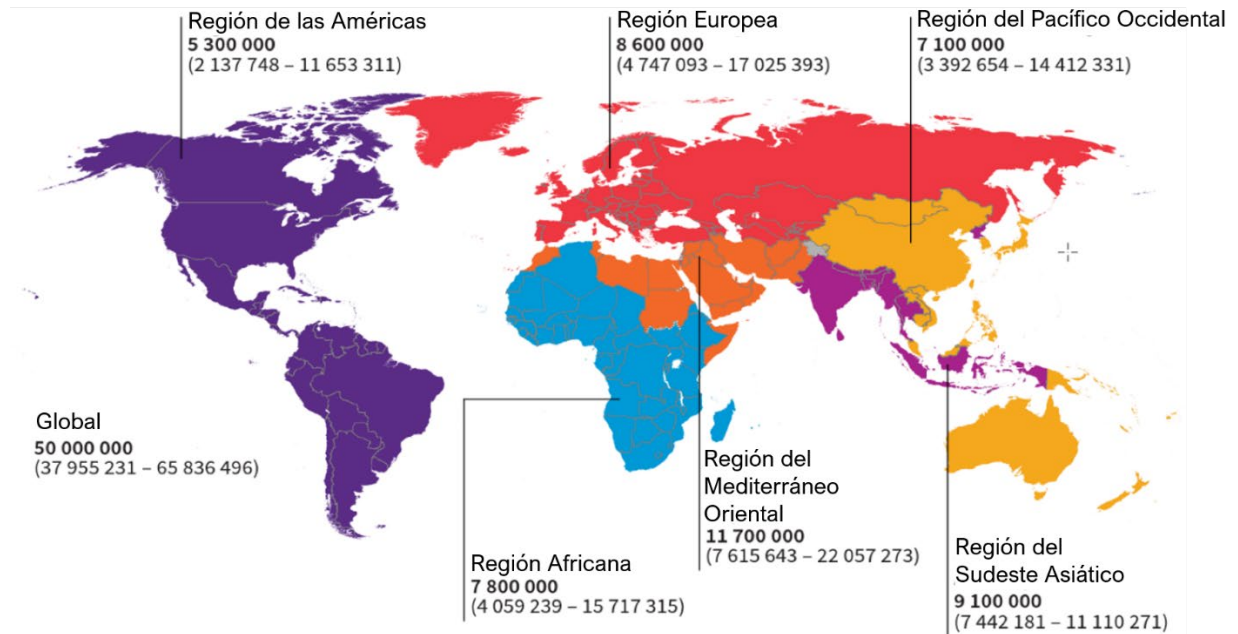


Figura 2. Prevalencia global por regiones reportadas por la OMS en 2022.(World Health Organization, 2024).

3.3. Vías de transmisión

La transmisión del VHC ocurre principalmente a través del contacto directo con sangre contaminada. En la actualidad, las vías de transmisión presentan una dicotomía geográfica. En los países desarrollados, el uso compartido de agujas y jeringas entre personas usuarias de drogas intravenosas (UDI) se ha convertido en el factor de riesgo predominante para las nuevas infecciones. Por el contrario, en muchos países en vías de desarrollo, la transmisión iatrogénica y nosocomial sigue siendo una fuente primordial de contagio, principalmente debido a procedimientos médicos inseguros, inyecciones terapéuticas con equipo no esterilizado y lesiones por punción en entornos de atención médica con recursos limitados (Fasano et al., 2024; Stroffolini & Stroffolini, 2024). Otras vías, aunque catalogadas como secundarias o menos eficientes, son la transmisión vertical durante el parto, el contacto sexual sin protección especialmente entre hombres que tienen relaciones sexuales con hombres y pacientes con comorbilidades infecciosas como el VIH, así como prácticas socioculturales que implican exposición percutánea, como el uso de equipos no esterilizados para tatuajes, perforaciones corporales y ciertas prácticas tradicionales (Prasad et al., 2023).

3.4. Agente etiológico

El virus de la hepatitis C (VHC) pertenece al género *Hepacivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. Presenta una alta diversidad genética, clasificándose en 8 genotipos con más de 100 subtipos (Vo-Quang & Pawlotsky, 2024).

3.4.1. Organización genómica del VHC

El genoma del VHC es una molécula de ARN monocatenaria de sentido positivo de aproximadamente 9.6 kilobases (kb), que contiene un único marco de lectura abierto (ORF) flanqueado por regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3'. La región 5' UTR posee un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que permite la traducción cap-independiente de la poliproteína viral. Esta poliproteína, de alrededor de 3,000 aminoácidos, es procesada co- y postraduccionalmente por proteasas virales y celulares en 10 proteínas funcionales: Core, E1, E2 y p7 son proteínas estructurales, mientras que NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B son no estructurales (Matthaei et al., 2024; Yamamoto et al., 2015) (**Figura 3**).

Core es la proteína que forma la cápside del virus, encapsulando el ARN genómico. Además de su función estructural, interactúa con gotas lipídicas y el retículo endoplásmico (RE), facilitando la transferencia del genoma viral a sitios de ensamblaje y contribuyendo a la envoltura del virión. También modula la respuesta inmune del hospedero, suprimiendo la producción de IL-12 y óxido nítrico en macrófagos y monocitos humanos activados (Mani et al., 2022).

La proteína F (Core+1) se genera mediante un cambio en el marco de lectura ribosomal (+1) en el codón 10 del gen Core, o por inicios de traducción alternativos. Actúa como un potente evasor inmunológico debilitando la respuesta innata al aumentar la apoptosis de las células dendríticas y reduciendo la secreción de interferones (IFN- α , IFN- γ) (Mohamadi et al., 2020). A nivel celular, promueve la expansión de linfocitos T reguladores productores de IL-10 y genera linfocitos T CD8+ con baja expresión de granzima B, provocando un sesgo en la respuesta Th1/Th2 que debilita el ataque contra el virus. Además, se ha evidenciado que altera el ciclo celular del hepatocito al regular la sobreexpresión de oncogenes como c-myc, ciclina D1 y pRb, mientras disminuye la expresión del gen supresor de tumores p53 (Samrat et al., 2014).

E1 y E2 son glicoproteínas de la envoltura viral que forman heterodímeros esenciales para la entrada del virus en las células hepáticas. E1 actúa como subunidad fusogénica, facilitando la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, mientras que E2 se encarga del reconocimiento y unión a receptores celulares como CD81 y SR-BI (Kumar et al., 2023).

p7 es una proteína de membrana que forma canales iónicos (viroporinas), cruciales para la maduración y liberación de nuevas partículas virales. Aunque no es esencial para la replicación del ARN, su ausencia afecta la infectividad del virus (Oestringer et al., 2019).

NS2 actúa como una proteasa que media la escisión entre NS2 y NS3, un paso esencial para la maduración de la poliproteína. Además, participa en el ensamblaje de partículas virales, interactuando con proteínas estructurales y no estructurales. La palmitoilación de NS2 regula su localización subcelular y su función en el ensamblaje viral (Wu et al., 2019).

NS3 es una proteína multifuncional con actividad de serina proteasa en su extremo N-terminal, responsable del procesamiento de las proteínas NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Su extremo C-terminal posee actividad helicasa y NTPasa, facilitando el desenrollamiento del ARN durante la replicación. NS3 también puede interferir con la respuesta inmune del hospedero, contribuyendo a la persistencia viral (Ikram et al., 2020).

NS4A es un cofactor esencial para la actividad proteasa de NS3, estabilizando su estructura y facilitando su anclaje a las membranas del retículo endoplásmico, donde ocurre la replicación viral. Además, NS4A interactúa con otras proteínas virales, como E1, y participa en la incorporación del ARN viral en partículas infecciosas (Pascut et al., 2021).

NS4B induce la formación de la “red membranosa”, una estructura derivada del retículo endoplásmico que sirve como plataforma para la replicación del ARN viral. También puede modular vías de señalización celular, contribuyendo a la persistencia viral. La interacción de NS4B consigo misma a través de su dominio C-terminal es crucial para la formación de complejos de replicación funcionales (Ouldali et al., 2021).

NS5A es una fosfoproteína multifuncional que participa en la replicación del ARN y en el ensamblaje de nuevas partículas virales. Su fosforilación en sitios específicos, como la serina 225, regula su interacción con otras proteínas virales y factores celulares. Además, modula la respuesta

al interferón y puede inducir procesos como la autofagia y la mitofagia, afectando la homeostasis celular (Chu & Ou, 2021; Ke & Yeh, 2024; Matthaei et al., 2024).

En cuanto a NS5B, es la ARN polimerasa dependiente de ARN del VHC, encargada de sintetizar nuevas cadenas de ARN viral. Es el principal blanco de varios antivirales de acción directa, y su fosforilación por quinasas celulares, como Akt, regula su actividad y la replicación viral (Sabariego et al., 2021).

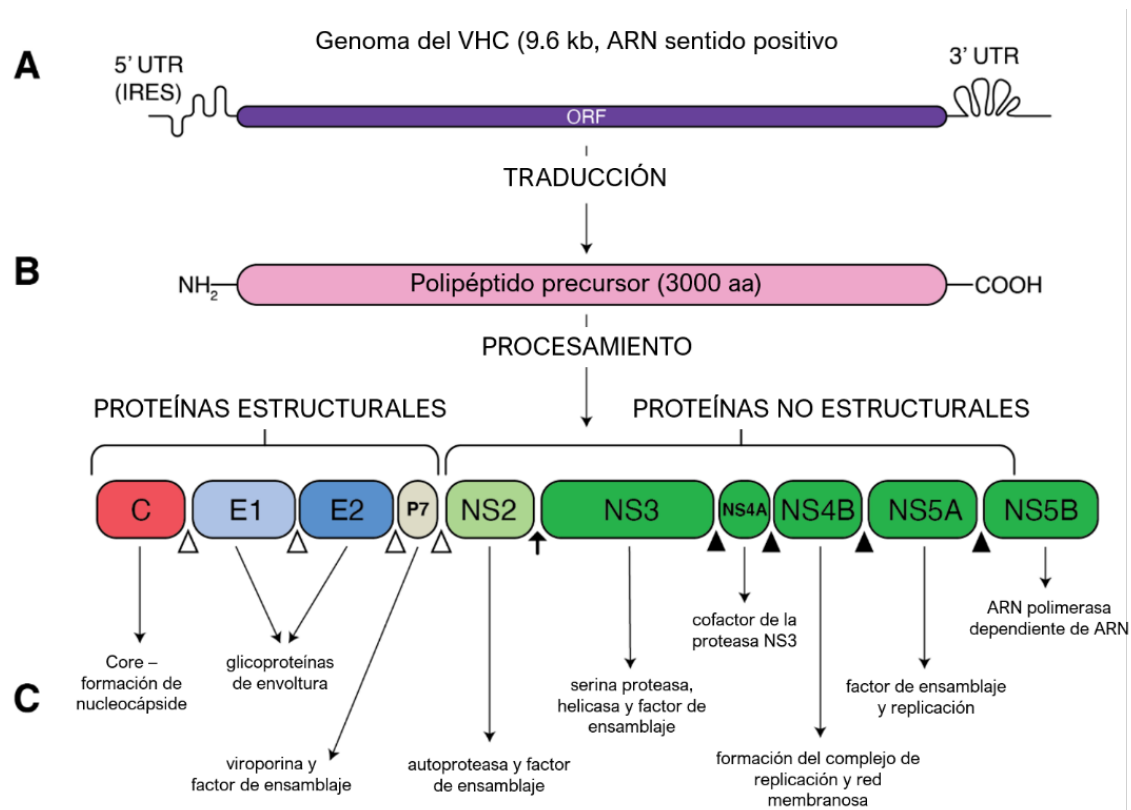


Figura 3. Representación esquemática del genoma y las proteínas del VHC. (A) El único marco de lectura abierto (ORF) del genoma del VHC está flanqueado por una región no traducida 5' (5' UTR) que contiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y una 3' UTR. (B) La traducción mediada por el IRES forma una proteína precursora de 3000 aa, que luego es procesada en 10 proteínas diferentes. Las proteínas estructurales (core, E1, E2 y p7) son escindidas del precursor gracias a la peptidasa señal celular (triángulos vacíos). La proteasa NS2-NS3 se autoescinde (flecha negra). La proteasa NS3, con NS4A como cofactor, escinde las proteínas no estructurales restantes: NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B (triángulos negros). (C) Función de las proteínas estructurales y no estructurales resultantes (Sidorkiewicz & Brown, 2021).

3.4.2. Ciclo replicativo en células hepáticas

El VHC circula en la sangre asociado a lipoproteínas, formando partículas conocidas como lipovirionpartículas. La entrada al hepatocito se inicia con la interacción de la partícula viral con receptores específicos en la superficie celular, incluyendo el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R), el receptor de clase B tipo I (SR-BI), CD81, claudina-1 y ocludina (Awadh, 2023). Estas interacciones facilitan la endocitosis mediada por clatrina, permitiendo la internalización del virus en la célula. Una vez dentro del endosoma, la acidificación induce la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal, liberando el ARN genómico de cadena positiva en el citoplasma del hepatocito (**Figura 4**).

El ARN viral es traducido por los ribosomas del hospedero en una única poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. Esta poliproteína es posteriormente procesada por proteasas virales y celulares para generar las proteínas virales. En esta etapa, la replicación del VHC depende críticamente de factores del hospedero, destacando el microARN hepático miR-122, el cual se une al extremo 5' del ARN viral para estabilizarlo y promover su replicación (Kunden et al., 2020).

Las proteínas no estructurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B se ensamblan en el retículo endoplásmico para formar el complejo de replicación, que induce la formación de las redes membranosas para la síntesis del ARN viral (Ouldali et al., 2021). Dentro de esta red, que protege al virus de las defensas celulares, la ARN polimerasa dependiente de ARN NS5B sintetiza una hebra de ARN de cadena negativa utilizando el ARN genómico como molde. Esta sirve posteriormente como plantilla para la síntesis de nuevas hebras de ARN de cadena positiva, que son utilizadas para la traducción de proteínas virales o empaquetadas en nuevas partículas virales.

El ensamblaje de nuevas partículas virales ocurre en asociación con las gotas lipídicas del hepatocito, donde la proteína Core se une al ARN viral para formar la nucleocápside (Matthaei et al., 2024). Las proteínas de la envoltura (E1 y E2) se incorporan en la membrana del retículo endoplásmico, y la partícula viral adquiere su envoltura al brotar hacia la luz del retículo endoplásmico. Finalmente, las partículas virales maduras son transportadas a través del aparato de Golgi y liberadas al espacio extracelular mediante la vía secretora del hospedero (Li et al., 2021a, 2021b).

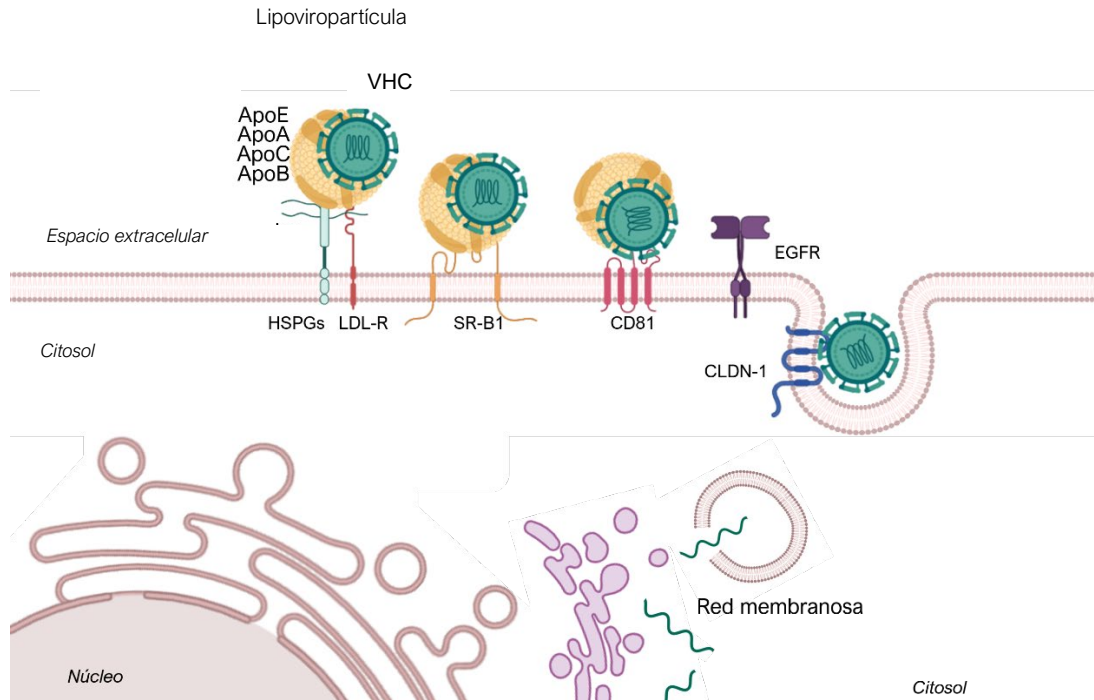


Figura 4. Mecanismo de entrada del virus de la hepatitis C. El proceso de infección inicia con el anclaje de la lipoviripartícula (VHC asociado a apolipoproteínas como ApoE, ApoA, ApoC y ApoB) a los factores de adhesión en la membrana celular basal, como los HSPGs y el receptor LDL-R. A continuación, el virus interactúa de forma secuencial con receptores específicos: primero con el SR-B1 y posteriormente con el CD81. Esta interacción, mediada por correceptores como el EGFR, promueve el desplazamiento del complejo viral hacia las uniones estrechas, donde se asocia con la claudina-1 (CLDN-1). La formación del complejo de correceptores del VHC es esencial para la subsecuente internalización viral a través de endocitosis mediada por clatrina y dependiente de dinamina. Finalmente, las vesículas endocíticas maduran a endosomas ácidos, promoviendo así la fusión del VHC dependiente de pH bajo, permitiendo la liberación del ARN genómico viral (Modificado de Colpitts et al., 2020).

3.4.3. VHC y estrés oxidativo

Si bien la inducción de estrés oxidativo es un mecanismo patofisiológico empleado por múltiples virus para evadir las defensas del hospedero, el VHC se distingue por desencadenar un desequilibrio redox más severo y crónico (Kayesh et al., 2025). Esta alteración se manifiesta mediante una sobreproducción sostenida de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una alteración en la homeostasis de los sistemas antioxidantes intracelulares (**Figura 5**). Este desequilibrio es el resultado de la expresión de las proteínas virales, las cuales comprometen simultáneamente a la

mitocondria, el retículo endoplásmico (RE) y las vías enzimáticas, promoviendo la progresión hacia la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (CHC) (Sander et al., 2022).

Prácticamente todas las proteínas del VHC tienen la capacidad de inducir la generación de ROS, siendo la proteína estructural Core y la proteína no estructural NS5A los inductores más potentes. El evento primario en esta cascada es la disfunción mitocondrial impulsada por la alteración en la homeostasis del calcio. Se ha documentado ampliamente que la proteína Core se localiza en la mitocondria y desencadena una liberación masiva de calcio desde el RE (Tardif et al., 2002; Hino et al., 2019). La subsecuente captación de este catión por la mitocondria inhibe directamente el Complejo I de la cadena de transporte de electrones, colapsando el potencial de membrana (Quarato et al., 2013). Esto genera una producción excesiva de ROS y crea un ciclo de retroalimentación positiva entre la desregulación del calcio y el desequilibrio redox. Adicionalmente, el complejo proteico viral NS3/4A se encarga de escindir y neutralizar a la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS), interrumpiendo la cascada de señalización mediada por los receptores tipo RIG-I (RIG-I y MDA5), bloqueando la activación de los factores de transcripción IRF3 y NF- κ B, y suprimiendo así la producción de interferones de tipo I (Wang & Weinman, 2013). En conjunto, estas alteraciones inducen una desregulación en la permeabilidad mitocondrial y activan mecanismos de mitofagia (Kim et al., 2013).

El VHC induce además un profundo estrés en el RE. Durante la infección, la rápida replicación viral y la acumulación de la proteína estructural E2 en forma de agregados mal plegados superan la capacidad de plegamiento del hepatocito (Chan & Egan, 2009). En respuesta, la célula activa dos vías de señalización, la Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR) y la Respuesta de Sobrecarga del RE (EOR) (Chusri et al., 2016). Por un lado, NS5A estimula la vía EOR al perturbar los niveles de calcio, lo que conduce a la activación de factores transcripcionales como NF- κ B y STAT-3, promoviendo un entorno celular proinflamatorio y proliferativo (Mccartney et al., 2013). Por otra parte, la acumulación proteotóxica induce la UPR, promoviendo la escisión y translocación nuclear del factor de respuesta al estrés ATF6 para transcribir genes de supervivencia celular, incluyendo chaperonas (Hu et al., 2022). Fisiológicamente, la UPR implica la atenuación de la traducción global para evitar una mayor acumulación de proteínas. Sin embargo, el VHC fuerza el mantenimiento de la traducción dependiente e independiente de la caperuza para asegurar la síntesis de sus propios componentes virales y la de chaperonas del hospedero, como GRP78, las

cuales facilitan el plegamiento viral (Wei et al., 2016). En conjunto, esta modulación transcripcional y traduccional le permite al VHC reprogramar la maquinaria de estrés del hospedero, prevenir la apoptosis temprana del hepatocito para sostener su replicación y, a su vez, instaurar un estado de estrés crónico del RE que exacerba el daño tisular a largo plazo (Hu et al., 2022).

Además del daño directo a los organelos, el VHC modula vías enzimáticas específicas generadoras de radicales libres. Se ha demostrado que la proteína NS5A, a través de su dominio I, promueve la producción de ROS activando de forma directa la transcripción del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) y de las enzimas NADPH oxidasas 1 y 4 (NOX1 y NOX4), siendo la inducción de estas últimas mediada por la sobreproducción del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) (Smirnova et al., 2016a). Esta hiperactivación enzimática perpetúa el desequilibrio redox y exacerba el daño oxidativo en el hepatocito.

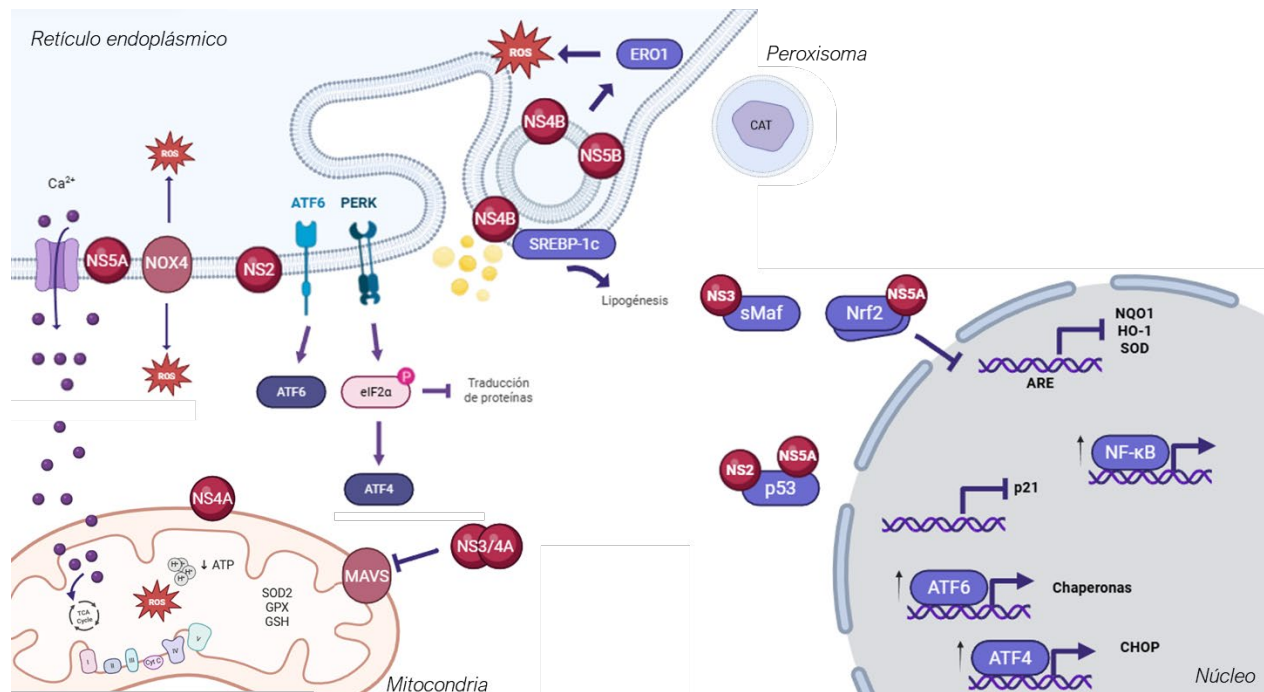


Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos de estrés celular y alteración metabólica inducidos por las proteínas del VHC. La imagen ilustra cómo las proteínas no estructurales del virus interactúan con distintos orgánulos para inducir estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico (RE) y modificar la expresión génica.

3.4.4. VHC y sistemas antioxidantes

Para atenuar la citotoxicidad inherente a las ROS y preservar la homeostasis redox, el hepatocito cuenta con diversos mecanismos de defensa antioxidante. Estos comprenden moléculas como glutatión (GSH) y tioredoxina, o enzimas desintoxicantes de fase II, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la hemo oxigenasa-1 (HO-1) (Lozano-Sepulveda et al., 2015).

El hígado constituye el principal sitio de biosíntesis de GSH, un tripéptido tiol cuya función es amortiguar el estado redox celular (Marí et al., 2020). Durante los estadios iniciales de la infección, el VHC induce una depleción de las concentraciones intracelulares de GSH. Concomitantemente, las concentraciones de su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG) se incrementan de forma significativa como resultado de la intensa actividad de neutralización de ROS derivada de las alteraciones mitocondriales y de la activación de complejos NOX. En consecuencia, el cociente GSH/GSSG presenta un desplazamiento hacia un estado oxidado (Anticoli et al., 2019). Diversos estudios sugieren que este microambiente oxidativo es un requerimiento para la amplificación del genoma viral y el establecimiento de la infección (Gullberg et al., 2014). En este periodo inicial, la respuesta celular se limita a una fuerte sobrerregulación transcripcional de la enzima glutatión reductasa (GR) en un intento por reciclar GSH a partir de GSSG, mecanismo que resulta insuficiente ante la magnitud del estrés oxidativo (Anticoli et al., 2019).

La expresión de las enzimas antioxidantes está regulada predominantemente a nivel transcripcional por el factor nuclear derivado de eritroide 2, similar al 2 (*Nrf2*) (Karunatileke et al., 2021). En condiciones fisiológicas, Nrf2 se encuentra confinado en el citoplasma, formando un complejo inactivo con la proteína adaptadora Keap1. Bajo estrés oxidativo, la activación de cinasas como PKC, PI3K y cascadas MAPK cataliza la fosforilación de Nrf2, induciendo su disociación de Keap1 y su posterior translocación nuclear. En el núcleo, Nrf2 forma heterodímeros y se une a Elementos de Respuesta Antioxidante (ARE) ubicado en las regiones promotoras de diversos genes que desencadenan una respuesta antioxidante (Kalantari et al., 2023; Ngo & Duennwald, 2022)

El VHC ejerce una modulación sobre el eje Nrf2/ARE. Se ha evidenciado que proteínas como Core inhiben la sobreexpresión de enzimas como HO-1 y SOD2 inducida por estrés. Esta alteración resulta necesaria en la patogénesis viral, dado que la disfunción de la vía Nrf2/ARE y los niveles controlados de ROS facilitan la autofagia y el ensamblaje viral, mientras previenen la activación de cascadas apoptóticas que comprometerían la viabilidad del hepatocito infectado (Medvedev et al., 2017).

3.4.5. Consecuencias patofisiológicas del desbalance redox

El estado de estrés oxidativo crónico inducido por el VHC no solo modula vías de señalización y supervivencia, sino que se traduce en un ataque directo contra las macromoléculas celulares. Cuando la producción de ROS supera la capacidad de los sistemas antioxidantes, los radicales libres reaccionan con lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, comprometiendo la integridad estructural del hepatocito y alterando el microambiente hepático (Fu et al., 2016).

Las membranas celulares y organelares son particularmente susceptibles al daño inducido por las ROS debido a su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). El ataque de los radicales libres a estos ácidos grasos desencadena el proceso conocido como peroxidación lipídica (Ramana et al., 2013). Entre las consecuencias de la peroxidación de lípidos está la destrucción directa de los fosfolípidos, lo que altera de forma irreversible la fluidez, permeabilidad e integridad de las membranas. Además, se generan subproductos carbonílicos reactivos y altamente tóxicos como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el malondialdehído (MDA) (Ayala et al., 2014). A diferencia de las ROS primarias, cuya vida media es extremadamente corta y su radio de acción limitado, estos aldehídos secundarios poseen una mayor estabilidad, lo que les permite difundir a través de las membranas y propagar el daño hacia sitios alejados del origen inicial de la producción de radicales. Adicionalmente, los productos de la peroxidación lipídica funcionan como señales intracelulares que direccionan a la célula hacia distintas vías de muerte celular programada como apoptosis o ferroptosis (Endale et al., 2023; Su et al., 2019).

De manera paralela a la peroxidación lipídica, el exceso de ROS genera un impacto en las proteínas celulares. La alteración proteica oxidativa más frecuente es la carbonilación, una modificación postraduccional irreversible y no enzimática (Kinhale & Khyade, 2019). Este proceso se produce

principalmente a través del ataque oxidativo directo a los residuos de aminoácidos, o mediante la conjugación covalente con especies carbonílicas reactivas secundarias, las cuales provienen justamente de la peroxidación lipídica previamente descrita.

La introducción de grupos carbonilo altera el sistema de plegamiento mediado por chaperonas, induciendo cambios conformacionales que inactivan a las proteínas. En un estado de estrés oxidativo crónico, la producción masiva de estas proteínas aberrantes satura e inhibe la maquinaria de degradación. Como resultado, las proteínas oxidadas se acumulan y forman agregados que exacerbaban la disfunción celular (Boguszewska-Mańkowska et al., 2015). Diversos estudios han documentado que los pacientes infectados con el VHC presentan niveles séricos de proteínas carboniladas significativamente más elevados en comparación con individuos sanos (Mohamed Alou-El-Makarem et al., 2014).

El impacto más crítico del estrés oxidativo es el daño directo al material genético. La interacción de los radicales libres con el ADN conduce a modificaciones estructurales como la oxidación de los residuos de guanina, que da lugar a la formación de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) o su base equivalente, la 8-oxoguanina (8-oxoG) (Graille et al., 2020). Su relevancia patológica radica en su alto potencial mutagénico, ya que, durante la replicación celular, la presencia de esta base modificada induce errores de apareamiento, generando mutaciones puntuales en las cadenas de ADN hijas. En modelos celulares de hepatoma humano, se ha demostrado que la infección por el VHC provoca un incremento masivo en los niveles de ROS de 30 a 60 veces superiores a los de células no infectadas, lo cual se traduce directamente en un aumento de hasta seis veces en la acumulación intracelular de 8-oxoG (Tanaka et al., 2008). Si esta inestabilidad genómica no es reparada, las mutaciones acumuladas pueden alterar genes supresores de tumores y protooncogenes (Pal et al., 2010). En conjunto, el daño continuo a lípidos, proteínas y ADN consolida un ambiente proinflamatorio y profibrótico del microambiente hepático, lo cual promueve, al menos en parte, la fibrogénesis tisular y la progresión hacia el carcinoma hepatocelular (Fu et al., 2016).

3.5. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) se puede realizar mediante la detección de anticuerpos específicos en sangre. Para ello, se utilizan pruebas serológicas como los inmunoensayos enzimáticos (ELISA), sin embargo, estas presentan limitaciones en términos de especificidad y sensibilidad (Sharma & Murthy, 2025). Las técnicas moleculares, en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se consideran los métodos más sensibles y precisos para diagnosticar la infección activa por VHC, ya que permiten detectar el ARN viral y cuantificar la carga viral (Maness et al., 2021). La PCR es especialmente útil en las etapas tempranas de la infección, en pacientes inmunosuprimidos y para el monitoreo de la respuesta al tratamiento. Además, la determinación del genotipo mediante estos métodos resulta fundamental para trazar estudios epidemiológicos y guiar los regímenes de tratamiento evaluando posibles resistencias a los tratamientos (Cuypers et al., 2016).

El primer tratamiento aprobado consistió en la administración de interferón alfa (IFN- α) convencional en forma monoterapéutica. Esta estrategia se basaba en la capacidad del interferón para modular la respuesta inmune del hospedero y ejercer efectos antivirales inespecíficos. Sin embargo, su eficacia era severamente limitada, presentando tasas de Respuesta Viroológica Sostenida (RVS), definida como la ausencia de ARN viral detectable 12 a 24 semanas después de finalizar la terapia, que no superaban el 10-20% en la mayoría de los pacientes, además de asociarse a una alta toxicidad sistémica (Alqahtani & Sulkowski, 2019). Posteriormente, la combinación de interferón pegilado (Peg-IFN) con ribavirina se estableció durante muchos años como el tratamiento estándar para la hepatitis C. Aunque esta terapia logró incrementar las tasas de curación a un 40-50%, el tratamiento prolongado de 24 a 48 semanas y el perfil de efectos adversos limitaban la adherencia y la elegibilidad de los pacientes (Di Marco et al., 2025).

El desarrollo de los Antivirales de Acción Directa (DAAs) revolucionó la terapia contra el VHC. Estas moléculas fueron diseñadas para inhibir de forma específica dianas proteicas no estructurales altamente conservadas y esenciales para la replicación del VHC. Al ser inhibidores directos, los DAAs inducen una rápida caída en los niveles séricos de ARN viral (Thompson et al., 2009). Clínicamente, se agrupan en tres familias principales: los inhibidores de la proteasa NS3/4A (ej. boceprevir, telaprevir, simeprevir, glecaprevir), los inhibidores del complejo de replicación NS5A (ej. ledipasvir, daclatasvir, velpatasvir, pibrentasvir) y los inhibidores de la polimerasa NS5B, que

incluyen variantes nucleotídicas y no nucleotídicas (ej. sofosbuvir, dasabuvir) (Feld et al., 2015; Pearlman & Hinds, 2018). La administración combinada y pangenotípica de estos fármacos ha transformado al VHC en una infección viral curable. Los regímenes actuales se caracterizan por una duración estándar acortada de 8 a 12 semanas, un buen perfil de seguridad y tolerabilidad, y tasas de RSV que superan el 95% en la población general, incluyendo a pacientes con cirrosis compensada y coinfección por VIH (Bhattacharya et al., 2023; Pawlotsky et al., 2020; Toyoda, 2022).

3.6. Riesgo de CHC residual y desafíos globales

A pesar del innegable éxito farmacológico, cada vez son más los estudios que demuestran que la erradicación virológica no anula por completo el riesgo de desarrollar CHC (Aydin et al., 2025; Na & Song, 2019; Xie & Singal, 2025). Este riesgo residual latente es consecuencia del daño hepático crónico acumulado y de la persistencia de una huella genética y epigenética aberrante instaurada en los hepatocitos tras la infección crónica y el estrés oxidativo sostenido. Datos epidemiológicos a largo plazo advierten que la incidencia anual de CHC en pacientes con fibrosis avanzada o cirrosis puede mantenerse entre un 2.5% y un 4.5% incluso después de la eliminación sostenida del virus (Kanwal et al., 2017; Na & Song, 2019). Debido a esto, las guías internacionales dictaminan que la vigilancia oncológica de por vida sigue siendo indispensable en todos los pacientes con fibrosis severa o cirrosis post-RVS.

Adicionalmente, aún persisten obstáculos para la erradicación de la enfermedad. La inexistencia de una vacuna preventiva, sumada a las disparidades socioeconómicas en el acceso global a los DAAs, dificultan el control epidemiológico. Por lo tanto, la detección oportuna en poblaciones vulnerables y la implementación de programas de cribado a gran escala continúan siendo desafíos de salud pública para lograr la eliminación global del VHC (Alshuwaykh & Kwo, 2020).

Más allá del manejo clínico, para hacer frente a esta persistente carga de morbimortalidad y dilucidar los mecanismos que perpetúan el daño oxidativo y el riesgo oncológico residual post-RVS, es necesario profundizar en la investigación básica del impacto patogénico del virus en la célula hospedera.

3.7. Modelos experimentales *in vivo* para estudiar el VHC

Debido al estrecho tropismo de especie que tiene el VHC, el desarrollo de modelos animales para estudiar la patogénesis viral ha representado un desafío. El chimpancé (*Pan troglodytes*) fue por mucho tiempo el único primate no humano susceptible a la infección experimental. Este modelo tuvo un rol fundamental en el descubrimiento del VHC y en el estudio de la respuesta inmunológica y clínica de la infección; no obstante, presenta notables diferencias patogénicas con los humanos: mientras que el 85% de las personas evolucionan a la cronicidad, solo el 30-40% de los chimpancés lo hacen, y prácticamente no desarrollan fibrosis o CHC. Actualmente, el uso de este modelo se encuentra restringido debido a su estatus como especie en peligro de extinción, sumado a estrictas consideraciones éticas y altos costos económicos de mantenimiento (Bukh, 2012; MacArthur et al., 2012). Otros modelos de mamíferos como la tupaya (*Tupaia belangeri*) han permitido una viremia persistente de bajo nivel y el desarrollo de trastornos hepáticos, sin embargo, su limitada disponibilidad y la incapacidad de soportar una replicación viral robusta restringen su utilidad (Bukh, 2012).

Para solventar estos problemas, se han desarrollado ratones transgénicos que expresan constitutivamente proteínas estructurales (Core, E1, E2) o no estructurales (NS3/4A) del VHC en el tejido hepático. El objetivo de este modelo es aislar el efecto biológico de proteínas virales específicas sobre la célula hospedero en un contexto *in vivo*. Pese a la utilidad de este enfoque, los resultados respecto al desarrollo de patologías hepáticas han sido contradictorios, ya que mientras algunos estudios no reportan daño hepatocelular evidente, otros describen el desarrollo progresivo de esteatosis hepática y CHC mediado por estrés oxidativo (Ploss & Kapoor, 2020).

Dado que los roedores no son naturalmente susceptibles a la infección por el VHC, el desarrollo más innovador para superar la barrera de especie ha sido la humanización del hígado mediante el trasplante de hepatocitos primarios humanos en ratones inmunodeprimidos. Para lograr un injerto exitoso sin rechazo, el ratón receptor debe ser inmunodeficiente y sufrir daño hepático previo, lo que permite a las células humanas proliferar y repoblar el parénquima hepático (DebRoy et al., 2016a). El modelo pionero en este campo es el ratón transgénico Alb-uPA cruzado con un fondo inmunotolerante (SCID). Estos ratones sobreexpresan el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) bajo el control del promotor de la albúmina murina, lo que induce la muerte celular de los hepatocitos murinos. Al inyectar hepatocitos humanos sanos, estos proliferan

selectivamente, llegando a repoblar hasta el 90% del hígado y restaurando la función metabólica (DebRoy et al., 2016b; Foquet et al., 2017). Este modelo quimérico ha demostrado ser altamente permisivo a la infección productiva por todos los genotipos del VHC, permitiendo la evaluación *in vivo* de fármacos antivirales y el estudio de la replicación del virus, aunque también presenta importantes limitaciones, como una alta letalidad neonatal, susceptibilidad a trastornos renales y dificultad de mantenimiento ya que carecen de un sistema inmunológico adaptativo funcional (Berggren et al., 2020; Burm et al., 2018).

3.8. Modelos experimentales *in vitro* para estudiar el VHC

Uno de los mayores obstáculos para el estudio *in vitro* de la infección completa ha sido la baja eficiencia de entrada del virus y su posterior replicación productiva. Estos procesos no dependen únicamente del genoma viral, sino de una compleja red de cofactores y proteínas específicas del hospedero, cuya ausencia en cultivos tradicionales se traduce en una escasa o nula producción de partículas virales infectivas (Ito et al., 2017; Narbus et al., 2011).

Ante esta limitación, se han desarrollado diversos sistemas *in vitro* para estudiar etapas individuales del ciclo de vida viral. El desarrollo de sistemas de replicones genómicos y subgenómicos (que codifican exclusivamente las proteínas no estructurales de NS3 a NS5B) permitió explorar la replicación intracelular del VHC (Lohmann et al., 1999a). Debido a que estos sistemas son incapaces de ensamblar o liberar partículas virales, paralelamente se desarrollaron pseudopartículas virales (HCVpp) para examinar los mecanismos de entrada celular; no obstante, al poseer una arquitectura retroviral, el sistema HCVpp falla en mimetizar la interacción fisiológica del virus con las lipoproteínas séricas y los complejos eventos de fusión de membranas (Lohmann & Bartenschlager, 2013). Uno de los mayores acercamientos al estudio de la patogénesis del HCV fue el establecimiento del sistema de cultivo de células infectadas (HCVcc) que se basa en el clon quimérico JFH-1, correspondiente a genotipo 2a aislado de un paciente japonés con hepatitis fulminante, el cual demostró la capacidad de replicarse, ensamblarse y liberar viriones infectivos (Ramirez & Bukh, 2018; Sainz et al., 2011).

Los sistemas de replicones y HCVcc dependen de líneas celulares de hepatoma humano altamente permisivas, fundamentalmente en la línea tumoral Huh-7 y sus derivadas (como Huh-7.5 y Huh-

7.5.1), las cuales adquirieron su alta permisividad a la infección debido a una mutación en RIG-I que las hace defectuosas en la activación del factor de transcripción IRF3 (Omura et al., 2019). En un intento por expandir las opciones experimentales más allá de los derivados de Huh-7, se desarrollaron otras líneas hepáticas modificadas, como la línea derivada de hepatoblastoma HepG2/CD81/miR-122, manipulada genéticamente para sobreexpresar factores provirales y soportar el ciclo de vida completo del VHC u otras líneas tumorales como Li23, KH y WRL68 (Kato et al., 2009; Narbus et al., 2011; Omura et al., 2019).

Una limitación metodológica que compromete los estudios realizados en estas líneas celulares es su linaje neoplásico. Al ser de origen tumoral, poseen una inestabilidad genómica inherente, defectos en la inmunidad innata, vías de señalización apoptóticas alteradas y perfiles metabólicos profundamente modificados (Qiu et al., 2016; Wisniewska et al., 2025; Zhao et al., 2018). Por consiguiente, evaluar mecanismos de daño temprano, viabilidad celular y vías de estrés oxidativo en un entorno que *per se* ya es tumoral, puede enmascarar o distorsionar la interpretación de los verdaderos mecanismos patogénicos inducidos por el virus.

Frente a este sesgo, el uso de hepatocitos primarios humanos (PHH) representa el acercamiento biológico idóneo para estudiar la infección en un ambiente hepático metabólicamente sano (Lowey & Li, 2018). Sin embargo, la viabilidad de este modelo se encuentra restringida por la complejidad de su obtención, la alta variabilidad genómica entre donadores y la rápida desdiferenciación fenotípica que sufren en cultivo. Estos factores, en conjunto, ponen de manifiesto la necesidad de modelos alternativos para el estudio del VHC.

4. JUSTIFICACIÓN

El virus de la hepatitis C representa aún un importante problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia y su capacidad para inducir daño hepático progresivo, que puede culminar en cirrosis o carcinoma hepatocelular. El estudio de sus mecanismos moleculares, en particular los mediados por las proteínas no estructurales (NS2 a NS5B), es esencial para comprender su replicación, su interacción con las células hospedadoras y su contribución a la patogénesis hepática, incluso tras la resolución de la infección.

Tradicionalmente, los estudios sobre la fisiopatología del VHC se han llevado a cabo en líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma, como Huh-7. Sin embargo, estas líneas tumorales presentan alteraciones genéticas significativas que pueden influir en las respuestas celulares al estrés, la activación de vías de señalización, el control del ciclo celular y de la muerte celular, lo que limita su capacidad para mimetizar adecuadamente la respuesta del hepatocito sano al virus.

En este contexto, establecer un modelo de expresión transitoria de las proteínas NS2–NS5B del VHC línea celular no tumoral THLE-2, constituye una estrategia potencialmente útil para estudiar alteraciones en las funciones celulares, que no han podido ser dilucidadas en los modelos tumorales actuales.

5. HIPÓTESIS

La transfección de un vector que codifica las proteínas no estructurales del VHC en la línea celular derivada de hepatocitos no tumoral THLE-2 permite establecer un modelo celular funcional de expresión transitoria.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Establecer un modelo celular de expresión transitoria de las proteínas no estructurales del virus de la hepatitis C (NS2-NS5B) en células hepáticas tumorales y no tumorales, que permita evaluar su efecto sobre el estrés oxidativo.

6.2. Objetivos específicos

1. Diseñar y caracterizar un vector de expresión que codifique las proteínas no estructurales del VHC (NS2-NS5B).
2. Evaluar el efecto de la transfección del vector en la viabilidad y la muerte celular de la línea hepática no tumoral THLE-2 y la línea de hepatocarcinoma Huh-7.
3. Analizar la expresión de las proteínas del VHC a nivel transcripcional y traduccional en células THLE-2, y Huh-7 transfectadas.
4. Determinar el efecto de la expresión de las proteínas del VHC en la generación de especies reactivas de oxígeno en el modelo de referencia Huh-7.

7. METODOLOGÍA

7.1. Estrategia experimental general

Para establecer un modelo celular de expresión transitoria de las proteínas no estructurales del virus de la hepatitis C, se diseñó *in silico* un vector que codifica los genes para tales proteínas. El vector se propagó en *E. coli* y una vez extraído, se caracterizó mediante digestión enzimática. Posteriormente, se llevó a cabo la transfección del vector en células THLE-2 y Huh-7. Se procedió a la evaluación de viabilidad celular por ensayos basados en permeabilidad de membrana y actividad metabólica. Posteriormente se realizó extracción de ARN y proteínas totales. El ARN extraído se utilizó para análisis de expresión génica mediante qPCR, mientras que la proteína total se evaluó por Western blot para confirmar la expresión de las proteínas no estructurales de VHC. Además, se determinaron marcadores asociados a estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno. (Figura 6).

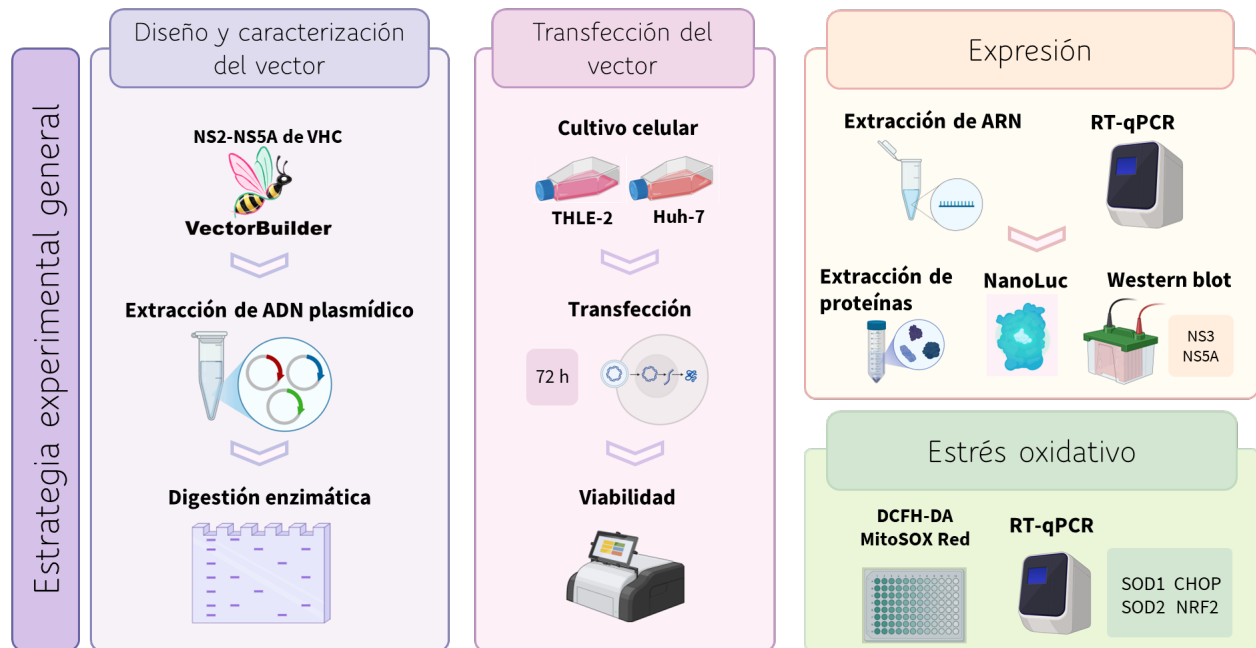


Figura 6. Estrategia experimental general del proyecto.

7.2. Diseño del vector de expresión de proteínas no estructurales del VHC

El diseño *in silico* del vector de expresión transitoria de las proteínas no estructurales del VHC se realizó empleando la plataforma VectorBee. Empleando como base el plásmido de expresión génica de mamíferos pRP basado en el vector pcDNA3, se incluyeron las regiones codificantes para NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B del virus de la hepatitis C genotipo 1b (GenBank: AJ238799.1). El diseño puede ser localizado en VectorBuilder (Guangzhou, China), bajo el siguiente número de ID: VB260617-1422edc. Para asegurar una eficiente expresión en hepatocitos humanos, se incorporaron elementos regulatorios como el promotor constitutivo EF1 α , una secuencia Kozak río arriba del codón de inicio, y una señal de poliadenilación SV40 en el extremo 3'. Adicionalmente, en el extremo 5' del casete de expresión, se incluyó el gen de la nano luciferasa (Nluc) como reportero quimioluminiscente (GenBank: OK425853.1), separado de la región de los genes virales mediante una secuencia T2A, que permite la traducción de ambos elementos como productos independientes a partir de un único transcrito. El plásmido empleado como control incluyó los mismos elementos, a excepción de la región codificante de las proteínas virales.

Se partió de bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con los plásmidos previamente descritos, adquiridas de VectorBuilder, las cuales se cultivaron en caldo LB con 100 μ g/mL de ampicilina. Para la extracción de los plásmidos se empleó el QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante, y las concentraciones y parámetros de calidad se determinaron mediante espectrofotometría NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

7.2.1. Caracterización del vector

Para la confirmación de la identidad, peso e integridad de los plásmidos extraídos, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% cargando 1 μ g de cada plásmido en su estado nativo, y 1 μ g de cada plásmido digerido con la enzima de restricción ApaLI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) incubada a 37 °C durante 16 horas conforme a lo descrito en la **Tabla 1**.

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

Reactivo	Cantidad
Enzima <i>Apa</i> LI (100 U/ μ L)	1 μ L
NEBuffer 4 (10X)	2 μ L
Plásmido extraído	1 μ g
Agua DEPC	c.b.p. 20 μ L

7.3. Subcultivos celulares

Para el desarrollo del proyecto se empleó la línea celular epitelial THLE-2 adquirida de ATCC (CRL-2706), derivada de hígado humano, establecida a partir de hepatocitos inmortalizados mediante transfección con el antígeno T grande del virus SV40. Estas células presentan morfología epitelial cúbica o poligonal y forman monocapas bien definidas. Dado que las células THLE-2 requieren una superficie recubierta con proteínas de matriz extracelular para adherirse adecuadamente, se utilizó una mezcla de colágeno tipo I (300 μ g/mL), fibronectina (100 μ g/mL) y albúmina sérica bovina (100 μ g/mL) diluida en medio de cultivo en proporción volumétrica de 10:1:1:88 (v/v/v/v). Esta composición proporciona un soporte bioquímico que imita parcialmente la matriz extracelular hepática y favorece la morfología epitelial característica de la línea. El cultivo se realizó a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂, empleando como medio base Bronchial Epithelial Cell Basal Medium (BEBM, Lonza) suplementado con el kit BEGM SingleQuots (Lonza, Cat. No. CC-4175), que contiene extracto pituitario bovino (0.13 mg/mL), factor de crecimiento epidermal (hEGF) (0.5 ng/mL), hidrocortisona (0.5 μ g/mL), insulina (5 μ g/mL), transferrina (10 μ g/mL), ácido retinoico (0.1 ng/mL) y triyodotironina (T3) (6.5 ng/mL), excluyendo del medio final la gentamicina y la epinefrina. Además, el medio se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 70 ng/mL de fosfatoetanolamina y 5 ng/mL adicionales de hEGF con el fin de optimizar el crecimiento y mantener la morfología epitelial de la línea.

Por otra parte, se empleó la línea celular Huh-7, una línea epitelial derivada de hepatocarcinoma humano (donada por el Dr. Koromilas, Universidad McGill, Montreal, Canadá). Estas células presentan morfología epitelial poligonal, elevada capacidad proliferativa y forman monocapas adherentes bien definidas. El cultivo de la línea Huh-7 se llevó a cabo a 37 °C en una atmósfera

con 5% de CO₂, utilizando como medio base ADMEM (Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 2% de SFB, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 1% de aminoácidos no esenciales (Todos los reactivos provenientes de Gibco, E.U.A).

Los procedimientos de subcultivo y mantenimiento de ambas líneas celulares se realizaron siguiendo los protocolos descritos en **Anexos**.

7.4. Transfección transitoria de los plásmidos en células THLE-2 y Huh-7

Para generar el sistema de expresión de las proteínas virales, se llevó a cabo la transfección por lipofección de los plásmidos en las células. Para ello, se sembraron en la densidad correspondiente al área de cada pozo, según lo establecido en **Anexos**.

1. Tras 24 horas de cultivo y, una vez que las células alcanzaron el 60-70% de confluencia, se procedió a preparar las mezclas de transfección utilizando el agente Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante (**Tabla 2**):

Tabla 2. Reactivos para la transfección transitoria mediante lipofección.

Mezcla	Componente	Formato de placa	
		96	6
A	OptiMEM	5.0 µL	125 µL
	Lipofectamina	0.1 µL	2.5 µL
B	OptiMEM	5.0 µL	125 µL
	p3000	0.2 µL	5 µL
	Plásmido	40 ng 20 ng	1.0 µg 0.5 µg

2. Las mezclas A y B se homogenizaron por inversión suave y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la formación de los complejos lipídico-ADN.
3. Los pozos se transfectaron añadiendo por goteo 250 µL, o 10 µL de la mezcla por pozo, según corresponda al formato de placa (6, o 96 pozos, respectivamente). Se procuró una

distribución uniforme, y al finalizar, la placa se agitó suavemente para permitir su adecuada mezcla con el medio de cultivo.

4. Las células se incubaron nuevamente bajo las condiciones estándar, durante 72 horas.

Se incluyeron los siguientes controles experimentales: células no transfectadas, células tratadas únicamente con Lipofectamine 3000 y células transfectadas con el vector control que expresa la luciferasa NanoLuc.

7.5. Ensayos de viabilidad y citotoxicidad

Para evaluar la viabilidad celular posterior a la transfección, se sembraron 10,000 células THLE-2 u 8,000 células Huh-7 por pozo en placas de 96 pozos. Setenta y dos horas después de la transfección, se realizaron los siguientes ensayos para obtener una evaluación integral de la viabilidad y la citotoxicidad:

7.5.1. Ensayo de viabilidad metabólica

El ensayo CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega), se fundamenta en la reducción del compuesto tetrazolio MTS por enzimas deshidrogenasas presentes en células metabólicamente activas, Este proceso genera un producto formazán soluble, cuya absorbancia es directamente proporcional a la viabilidad celular. Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

1. Tanto el reactivo MTS como la placa con células se equilibraron a temperatura ambiente durante 10 minutos previo a su uso.
2. Sin retirar el medio de cultivo, se añadieron 20 μ L de reactivo MTS por cada 100 μ L de medio en cada pozo.
3. La placa se incubó durante una hora a 37 °C, con 5 % CO₂.
4. La absorbancia de cada pozo se leyó a 490 nm en un lector de microplacas. La densidad óptica es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.
5. La viabilidad se calculó considerando la absorbancia de las células no tratadas como 100% aplicando la siguiente fórmula:

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

7.5.2. Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay (Promega), mide la actividad de proteasas liberadas al medio por células con membranas comprometidas. Este método genera una señal luminosa proporcional al grado de citotoxicidad inducida. Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

1. Tanto el reactivo CytoTox-Glo como la placa con células se equilibraron a temperatura ambiente durante 10 minutos previo a su uso.
2. El reactivo se preparó mezclando el buffer con el sustrato según las instrucciones del fabricante.
3. Para la medición de citotoxicidad, se añadió un volumen de reactivo equivalente 1:1 al volumen de medio presente en cada pozo.
4. La placa se agitó suavemente durante 30 segundos para permitir el contacto del reactivo con el medio.
5. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Se registró la luminiscencia correspondiente a la proteasa liberada por las células muertas.
7. Para determinar la proteasa total, se adicionó el reactivo de lisis provisto, se incubó durante 15 minutos y se realizó una segunda lectura de luminiscencia.
8. La citotoxicidad se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{Luminiscencia de las células muertas}}{\text{Luminiscencia total}} \times 100$$

7.6. Extracción de RNA total

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

1. Se removió el medio de cultivo mediante aspiración.
2. Se añadieron 400 μL de TRIzol a cada pozo de una placa de 6 pozos para lisar las células.
3. Se homogeneizó mediante pipeteo directamente en la placa hasta desprender completamente las células. Posteriormente, la suspensión celular se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se incubó por 5 minutos.
4. Se agregaron 80 μL de cloroformo frío y se mezcló por inversión durante 30 segundos.

5. El tubo se incubó por 3 minutos y se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C.
6. Se recuperó únicamente la fase acuosa en un tubo nuevo, procurando no tocar la interfase o la fase orgánica.
7. A la fase acuosa se le adicionaron 200 µL de isopropanol frío y se mezcló por inversión.
8. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C.
10. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla de ARN con 400 µL de etanol al 75%, mezclando brevemente mediante vórtex para despegar el pellet.
11. Se centrifugó a 7,500 x g por 5 minutos a 4 °C.
12. Se descartó el etanol con micropipeta, evitando tocar o desplazar el pellet de ARN.
13. Se dejó secar el *pellet* de 4 a 5 minutos a 30°C. Posteriormente, se resuspendió en 20 µL de agua tratada con DEPC.
14. Se incubó 10 minutos a 55°C.
15. Después de la lectura de concentración y pureza empleando Nanodrop, se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

7.7. Evaluación de la expresión génica mediante RT-qPCR

Se evaluó la expresión de genes celulares relacionados a estrés oxidativo inducido por la expresión de proteínas del VHC mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) empleando SYBR Green, previa retrotranscripción del ARN total extraído de las células, de la siguiente manera:

1. La retrotranscripción se realizó a partir de 2 µg de ARN total en un volumen de reacción final de 20 µL (200 ng/µL) de acuerdo con lo dispuesto en la **Tabla 3**.

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
dNTPs	10 mM	1 μL	500 μM
ARN total	200 ng/μL	10 μL	100 ng/μL
Colocar en termociclador a 65°C por 5 minutos			
Buffer First Strand	5X	4 μL	1 X
DTT	0.1 M	2 μL	10 mM
RNAsa OUT	40 U/μL	1 μL	2 U/μL
Colocar en termociclador a 37°C por 2 minutos			
RT-MMLV	200 U/μL	1 μL	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			

- El ADNc obtenido se diluyó para obtener alícuotas de 25 ng/μL para su uso en las reacciones de qPCR.
- Para la amplificación de los genes evaluados se prepararon mezclas de un volumen final de 10 μL con los reactivos de la **Tabla 4**:

Tabla 4. Reactivos para la qPCR a partir del ADNc.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (1rxn)	Concentración final
SYBR Green Master Mix	2X	5 μL	1 X
<i>Primer FW</i>	5-10 μM*	0.5 μL	250-500 nM*
<i>Primer RV</i>	5-10 μM*	0.5 μL	250-500 nM*
ADNc	25 ng/μL	2 μL	5 ng/μL
Agua DEPC	-	2 μL	-

*Los primers y su concentración varía dependiendo de cada gen (ver **anexos**).

4. Al obtener la mezcla de reacciones, se centrifugaron brevemente los tubos y se llevaron al termociclador de tiempo real bajo el siguiente programa:

Tabla 5. Condiciones para la qPCR.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Hold stage	50°C	2 minutos
	95°C	2 minutos
PCR (40 ciclos)	95°C	1 segundo
	60°C	30 segundos
Curva de disociación	95°C	15 segundo
	60°C	1 minuto
	95°C	15 segundos

5. Al finalizar, se recuperaron los números de Ct de cada una de las curvas de amplificación para calcular la expresión relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tomando como calibrador la condición control celular y normalizando el gen endógeno β -actina.

7.8. Cálculo de número de copias del transcrito de VHC

Para la obtención del número de copias de los transcritos del VHC se realizó una curva estándar utilizando distintas cantidades del plásmido. Después se calculó el número de copias de estos estándares aplicando la siguiente formula:

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

donde

- 6.022×10^{23} = Número de Avogadro
- 660g/mol = Masa de 1pb de ADN de doble cadena
- 1×10^9 = Factor de conversión

Una vez realizadas las diluciones para cada uno de los estándares se efectuó una qPCR de acuerdo con los datos de la **Tabla 6**. Se graficó 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 ARN de cultivo celular se aplicó la ecuación de la recta para obtener el número de copias de cada una de las muestras, normalizando los Ct con el promedio del Ct obtenido para el gen endógeno GAPDH.

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

Plásmido	Estándares (ng)	Número de copias	Log10
pHCV-T2A-NL (10,061 pb)	0.11	10,000,000	7.00
	0.011	1,000,000	6.00
	0.0011	100,000	5.00
	0.00011	10,000	4.00
	0.000011	1,000	3.00
	0.0000011	100	2.00

7.9. Extracción de proteínas totales

Para la evaluación de la expresión a nivel traduccional de las proteínas no estructurales del VHC se procedió a la extracción de proteína total de los cultivos celulares. Para ello, se aspiró el medio de cultivo de las células cultivadas en placas de 6 pozos, se lavaron dos veces con 500 μ L de PBS 1X frío para eliminar residuos de medio y suero, y las células se cubrieron con 70 μ L de buffer de lisis PKR 1X (**Anexos**). Las células se despegaron y homogeneizaron mediante raspado con un *scraper* estéril y se transfirió la suspensión a tubos preenfriados de 1.5 mL, se mezcló con vórtex 10 segundos y se incubó en hielo por 20 minutos, continuando con una centrifugación a 13,000 \times g durante 5 minutos a 4 $^{\circ}$ C para separar los restos celulares. El sobrenadante, correspondiente a la fracción proteica soluble, se recuperó transfiriéndolo a un tubo nuevo. La proteína se cuantificó por el método de Bradford y se almacenó a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso.

7.10. Cuantificación de proteínas totales por método de Bradford

La concentración de proteína total se determinó por método de Bradford utilizando el reactivo colorimétrico Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las determinaciones se realizaron como se describe a continuación:

1. Se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) empleando una solución madre (stock) comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, del cual se obtuvieron las diluciones necesarias para conformar la curva de cuantificación.
2. Se prepararon los estándares de la curva mediante diluciones seriadas de BSA, de acuerdo con la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cantidades empleadas para la preparación de los estándares de la curva de cuantificación.

Estándar	Stock de BSA	Agua	Concentración final
1	5 μL	95 μL	0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
2	10 μL	90 μL	1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
3	20 μL	80 μL	2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
4	40 μL	60 μL	4.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
5	80 μL	20 μL	8.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

3. En una placa de 96 pozos, se dispensó 1 μL de cada estándar, el cual se mezcló con 159 μL de agua ultrapura y 40 μL de Protein Assay Dye Reagent previamente homogeneizado, evitando la formación de burbujas. Todas las condiciones se prepararon por triplicado.
4. Una vez completada la preparación de todos los pozos, la placa se incubó protegida de la luz a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente se registró la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de microplacas.
5. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron frente a las concentraciones conocidas de los estándares para generar la ecuación de la recta. Esta ecuación se utilizó para determinar la concentración de proteína de todas las muestras experimentales.

6. Para la cuantificación de las muestras problema, se repitió el procedimiento descrito en los pasos 3 y 4 y, a partir de la absorbancia obtenida, se calculó la concentración proteica mediante interpolación en la ecuación de la curva estándar.

7.11. Evaluación de la expresión proteica mediante la actividad de NanoLuc

Para determinar la expresión de la proteína reportera codificada en el plásmido diseñado, se evaluó la actividad de la nano luciferasa partiendo de las muestras de proteína total previamente extraídas del cultivo celular y empleando el kit Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega, EE. UU.), como se describe en el protocolo:

1. Se permitió que los componentes del kit (Nano-Glo Luciferase Assay Substrate y Nano-Glo Luciferase Assay Buffer) alcanzaran la temperatura ambiente durante 5–10 minutos antes de iniciar el procedimiento.
2. Se preparó la cantidad requerida del reactivo de detección mezclando un volumen del sustrato con 50 volúmenes del buffer. Esta mezcla se homogeneizó suavemente por pipeteo y se consideró un volumen final de 5 μ L por pozo para el ensayo.
3. En una placa blanca de 96 pozos con fondo plano, se dispensaron 15 μ L de buffer de lisis PKR 1X en cada pozo. Posteriormente, se agregaron 5 μ L de cada muestra de proteína total, asegurando una mezcla uniforme mediante pipeteo suave.
4. Se añadieron 5 μ L del reactivo preparado (buffer:sustrato) a cada pozo, evitando la formación de burbujas.
5. La placa se protegió de la luz y se agitó suavemente durante 3 minutos a temperatura ambiente, permitiendo que ocurriera la reacción de quimioluminiscencia.
6. Los niveles de luminiscencia se midieron en un lector GloMax (Promega). Las señales obtenidas, expresadas en unidades relativas de luz (RLU), se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína total colocada en cada pozo, a fin de expresar la actividad de NanoLuc en RLU por mg de proteína.

7.12. Evaluación de la expresión proteica mediante Western blot

Una vez cuantificadas las proteínas, se procedió a evaluar la expresión de las proteínas del VHC mediante Western blot. Para ello, las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de

poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE), siguiendo el protocolo detallado a continuación:

7.12.1. SDS-PAGE

1. Se preparó un gel de SDS-PAGE compuesto por un gel separador y uno concentrador, ajustando el porcentaje necesario (**Anexos**).
2. Una vez polimerizados los geles, se prepararon 40 µg de proteína total de cada muestra, los cuales se mezclaron con el buffer de carga (**Anexos**) en una proporción 4:1 (v/v). Esta mezcla se calentó a 95 °C durante 10 minutos para la desnaturalización de las proteínas.
3. Se cargaron las muestras y un marcador de peso molecular preteñido en los pozos del gel.
4. La electroforesis se llevó a cabo utilizando el buffer de corrida (**Anexos**) a 100 V durante aproximadamente 2.5 horas, o hasta que el colorante del buffer de carga alcanzara el frente inferior del gel.

7.12.2. Transferencia a membrana PVDF

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm, siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Se recortó la membrana con dimensiones equivalentes al gel previamente corrido.
2. La membrana se activó mediante inmersión en metanol al 100% bajo agitación durante 5 minutos.
3. Posteriormente, se lavó con agua ultrapura durante 5 minutos y se equilibró en buffer de transferencia 1X (**Anexos**) durante otros 5 minutos.
4. Se humedecieron dos papeles filtro y dos esponjas en buffer de transferencia durante 5 minutos.
5. Se desmontó el gel y se ensambló el sándwich de transferencia en el siguiente orden: esponja, papel filtro, membrana, gel, papel filtro y esponja, asegurando el contacto completo entre gel y membrana y evitando la formación de burbujas.
6. El sándwich se colocó en la cámara de transferencia, se añadió un agitador magnético y un paquete refrigerante, y la cámara se llenó con buffer de transferencia.

7. La transferencia se llevó a cabo a 4 °C, con agitación constante, a 120 V o 350 mA durante 150 minutos.
8. Finalizado el proceso, se retiró la membrana y se verificó la correcta transferencia observando la presencia del marcador preteñido.
9. Se colocó la membrana en una solución de rojo de Ponceau (**Anexos**) hasta visualizar las bandas correspondientes a las muestras.
10. Finalmente, se eliminó el colorante lavando la membrana con TBS-T 1X (**Anexos**) hasta que desaparecieron las bandas rojas.

7.12.3. Inmunodetección

Una vez completada la transferencia, se procedió con la inmunodetección de las proteínas del VHC mediante el siguiente protocolo:

1. La membrana se incubó en solución de bloqueo (TBS-T 1X [**Anexo X**] con 10% de leche descremada) durante 30–60 minutos, bajo agitación suave a temperatura ambiente.
2. Posteriormente, se lavó la membrana con TBS-T 1X durante 5 minutos.
3. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en TBS-T 1X con 5% de leche, durante 16 horas a 4 °C bajo agitación constante.
4. Se lavó la membrana tres veces con TBS-T 1X durante 10 minutos cada vez, a temperatura ambiente y bajo agitación constante.
5. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario en TBS-T 1X con 5% de leche durante 2.5 horas.
6. Nuevamente, se realizaron tres lavados con TBS-T 1X durante 10 minutos cada uno.
7. Para la detección de la señal, se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico PLUS o SuperSignal West Femto, siguiendo las indicaciones del fabricante.
8. La membrana se reveló mediante un sistema de adquisición de imágenes ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

7.12.4. Análisis densitométrico

Para la obtención de la expresión relativa, se cuantificó la proteína endógena β -actina para normalización. La señal de quimioluminiscencia se analizó por densitometría utilizando el software ImageJ.

La expresión relativa de la proteína de interés se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cambio en número de veces} = \frac{\text{Expresión relativa de proteína de interés}}{\text{Expresión relativa de proteína endógena}}$$

donde:

- Expresión relativa de la proteína de interés = (Señal de la muestra) / (Señal del control)
- Expresión relativa de la proteína endógena = (Señal endógena de la muestra) / (Señal endógena del control)

7.13. Evaluación integral del estrés oxidativo

Para caracterizar el estado redox celular en respuesta a la expresión de proteínas del VHC, se emplearon ensayos para evaluar distintos niveles de la respuesta al estrés oxidativo.

7.13.1. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno mediante DCFH-DA

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó mediante la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína (DCF), derivada de la oxidación del compuesto no fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceínadiacetato (DCFH-DA) en presencia de peróxidos intracelulares, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se sembraron 8,000 células Huh-7 por pozo en placas de 96 pozos adecuadas para lecturas de fluorescencia, y se sometieron a las transfecciones correspondientes.
2. Se retiró el medio de cada pozo y las células se lavaron con PBS 1X.
3. El reactivo DCFH-DA se preparó diluyendo el stock de 5 mM hasta una concentración final de 1 μ M en medio sin rojo de fenol.
4. Se añadieron 100 μ L de la solución de trabajo de DCFH-DA por pozo.

5. Las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos en completa oscuridad para permitir la internalización y desacetilación del compuesto.
6. Al finalizar la incubación, se realizaron lavados breves con PBS 1X para eliminar el exceso de sonda no internalizada.
7. Posteriormente, se agregaron 100 µL de medio sin rojo de fenol a cada pozo.
8. La fluorescencia se cuantificó inmediatamente en un lector de microplacas GloMax a 529 nm/503 nm (emisión/excitación).
9. Los valores registrados se ajustaron restando la señal del blanco (pozos sin células).
10. Adicionalmente, se incluyó un control positivo de daño empleando H₂O₂ 2 mM.
11. Los valores de fluorescencia se normalizaron respecto a la cantidad total de proteína medida en pozos paralelos, y se reportan como porcentaje respecto al control basal.

7.13.2. Cuantificación de superóxido mitocondrial mediante ensayo de MitoSOX

La producción de ROS a nivel mitocondrial se evaluó mediante la fluorescencia emitida por la sonda MitoSOX Red que se oxida selectivamente por el superóxido mitocondrial siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Se sembraron 200,000 células Huh-7 en placas de 6 pozos con portaobjetos adecuados para microscopía y se sometieron a los tratamientos experimentales.
2. Se diluyó el stock MitoSOX 5 mM en HBSS 1X hasta obtener una concentración final de 2.5 µM y se añadió 1 mL de esta solución a cada portaobjetos.
3. Se incubaron las preparaciones durante 10 minutos a 37 °C, protegidas de la luz.
4. Tras la incubación, se lavaron los portaobjetos 3 veces con HBSS 1X a 37 °C para eliminar la sonda no internalizada.
5. Se fijaron las células con metanol frío y se lavaron las muestras con PBS 1X.
6. Se tiñeron los núcleos con Hoechst 33342 y se lavó el exceso de colorante con PBS 1X.
7. Se montaron los portaobjetos y se adquirieron imágenes utilizando el microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse Ts2 (Nikon, Tokio, Japón) con los filtros adecuados para MitoSOX (canal rojo) y Hoechst 33342 (canal azul).
8. Se cuantificó la intensidad de señal por célula o por campo usando el software ImageJ, y se normalizó por número de núcleos.

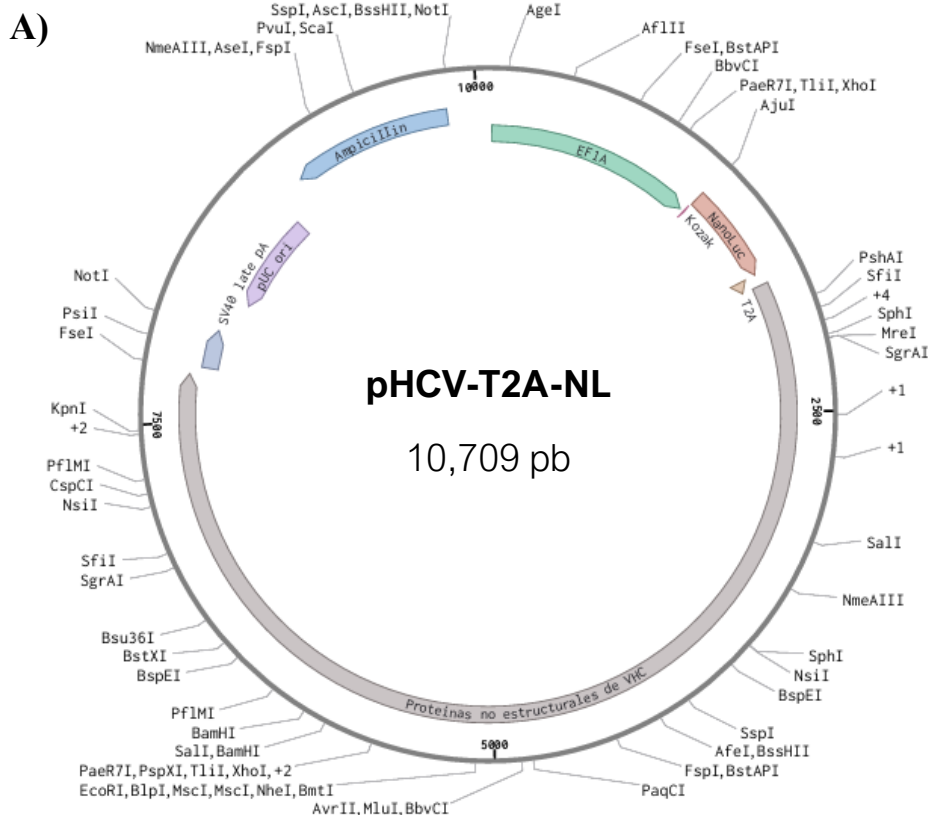
7.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico y la visualización de los datos se llevaron a cabo en el entorno y lenguaje de programación R. La manipulación, organización y limpieza de las bases de datos se realizó mediante las librerías del paquete *tidyverse*. Para evaluar las diferencias entre los grupos experimentales frente al control se emplearon modelos de análisis de varianza (ANOVA). Dependiendo del objetivo de la comparación, el análisis se complementó con pruebas múltiples *post-hoc* de Dunnett, Tukey o Bonferroni. Para las comparaciones entre dos grupos independientes se utilizó la prueba *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$. La representación gráfica de los resultados se generó con el paquete *ggplot2*, denotando la significancia estadística exclusivamente mediante asteriscos sobre los grupos correspondientes y omitiendo anotaciones o corchetes en las comparaciones no significativas para mantener la claridad visual. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los datos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Para el procesamiento de las imágenes y la cuantificación de la señal, se empleó el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.).

8. RESULTADOS

8.1. Diseño y caracterización de los plásmidos

El diseño *in silico* del plásmido codificante para las proteínas no estructurales del virus de la hepatitis C (denominado «pHCV-T2A-NL») se llevó a cabo mediante la plataforma VectorBee (VectorBuilder). La transcripción de este constructo se encuentra bajo el control del promotor eucariota EF1 α , para asegurar una expresión constitutiva en modelos celulares hepáticos. El diseño consta del gen codificante para la proteína reportera NanoLuc fusionado a la secuencia de un péptido escindible T2A. Este elemento induce un salto ribosomal, garantizando la expresión equimolar entre el gen reportero y la poliproteína viral, la cual abarca desde la proteína NS2 hasta la NS5B del virus de la hepatitis C genotipo 1b (GenBank: AJ238799.1). A su vez, se diseñó un vector del esqueleto vacío (denominado «pNluc») que codifica únicamente para la proteína NanoLuc, sin la secuencia correspondiente a la poliproteína viral. Este plásmido se empleó como control experimental para discriminar los efectos biológicos directamente atribuibles a las proteínas virales frente a las posibles alteraciones celulares derivadas del proceso de transfección *per se*. La representación esquemática de ambos mapas plasmídicos se muestra en la **Figura 7**.



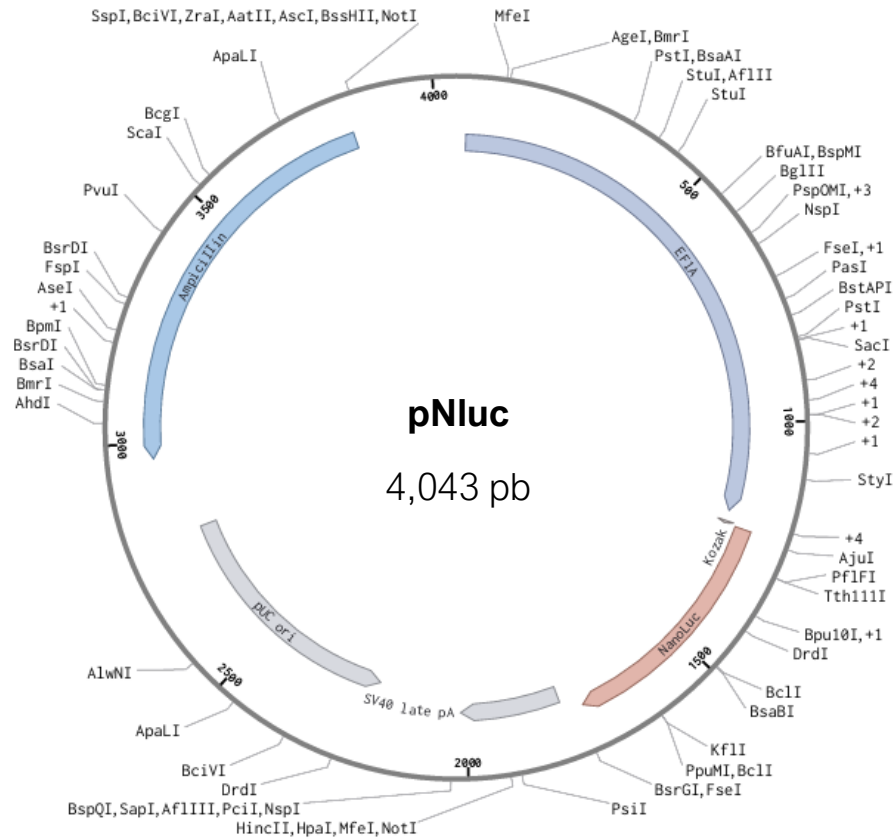
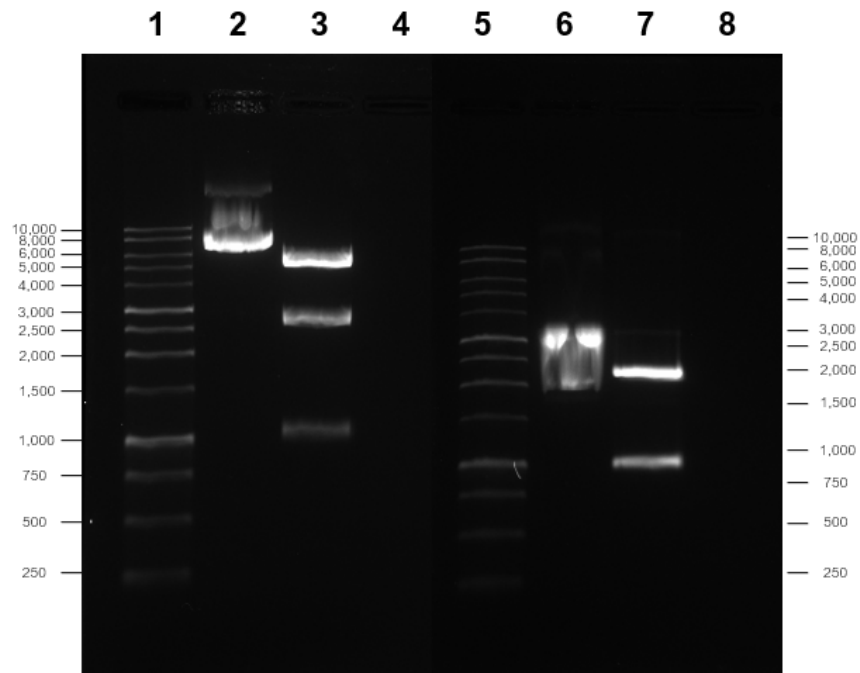
B)

Figura 7. Mapas esquemáticos de los plásmidos diseñados. A) Mapa esquemático del plásmido pHCV-T2A-NL (10,709 pb), B) Mapa esquemático del plásmido pNluc (4,043 pb).

Para la amplificación de los constructos, células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5 α transformadas con los plásmidos pHCV-T2A-NL y pNluc. Tras su propagación en medio de cultivo, se procedió a la purificación del ADN plasmídico mediante columnas. La evaluación de la identidad e integridad estructural de los vectores purificados se corroboró mediante un ensayo de digestión enzimática empleando la endonucleasa *ApaI*, seguido de una electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 8**). Como se observa en el patrón de bandas, el plásmido pHCV-T2A-NL íntegro presentó el tamaño esperado de 10,709 pb (carril 2), mientras que su digestión generó los tres fragmentos característicos proyectados de 6,196, 3,267 y 1,246 pb (carril 3). Por su parte, el vector pNluc mostró un peso sin digerir de 4,043 pb (carril 6) y, tras la restricción con *ApaI*, se resolvieron correctamente los dos fragmentos esperados de 2,797 y 1,246 pb (carril 7). Estos

hallazgos confirman la correcta conformación y secuencia de ambos plásmidos, validándolos para los ensayos de transfección posteriores.



Carril	Muestra	Enzima	Fragmentos (pb)
1, 5	Marcador	-	-
2	pHCV-T2A-NL	-	10,709
3	pHCV-T2A-NL	<i>ApaLI</i>	6,196
			3,267
			1,246
4, 8	Control negativo	<i>ApaLI</i>	-
6	pNluc	-	4,043
7	pNluc	<i>ApaLI</i>	2,797
			1,246

Figura 8. Caracterización del plásmido pHCV-T2A-NL y pNluc por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

8.2. Transfección y su efecto en la viabilidad metabólica

Una vez caracterizado el plásmido, se procedió a evaluar el efecto de la transfección sobre la viabilidad metabólica celular a las 72 horas post-transfección, seleccionando este punto temporal de expresión transitoria para alcanzar un nivel óptimo y estable de acumulación proteica intracelular. Al evaluar la línea de hepatocarcinoma Huh-7, se observó que la viabilidad celular disminuyó de manera significativa conforme se aumentó la dosis de 0.5 a 1.0 μg del vector pHCV-T2A-NL. A pesar de esta reducción dosis-dependiente, la actividad metabólica se mantuvo por encima del umbral de viabilidad establecido del 70% en ambas concentraciones (**Gráfico 1a**). Por otro lado, la viabilidad en la línea de los hepatocitos no tumorales THLE-2 mostró una mayor sensibilidad al constructo viral. Si bien la viabilidad también disminuyó de forma dependiente de la dosis, la transfección con la concentración máxima evaluada (1.0 μg) redujo la viabilidad metabólica significativamente por debajo del umbral del 70% (**Gráfico 1b**). En contraste, el empleo de 0.5 μg permitió mantener la viabilidad por encima de dicho límite establecido.

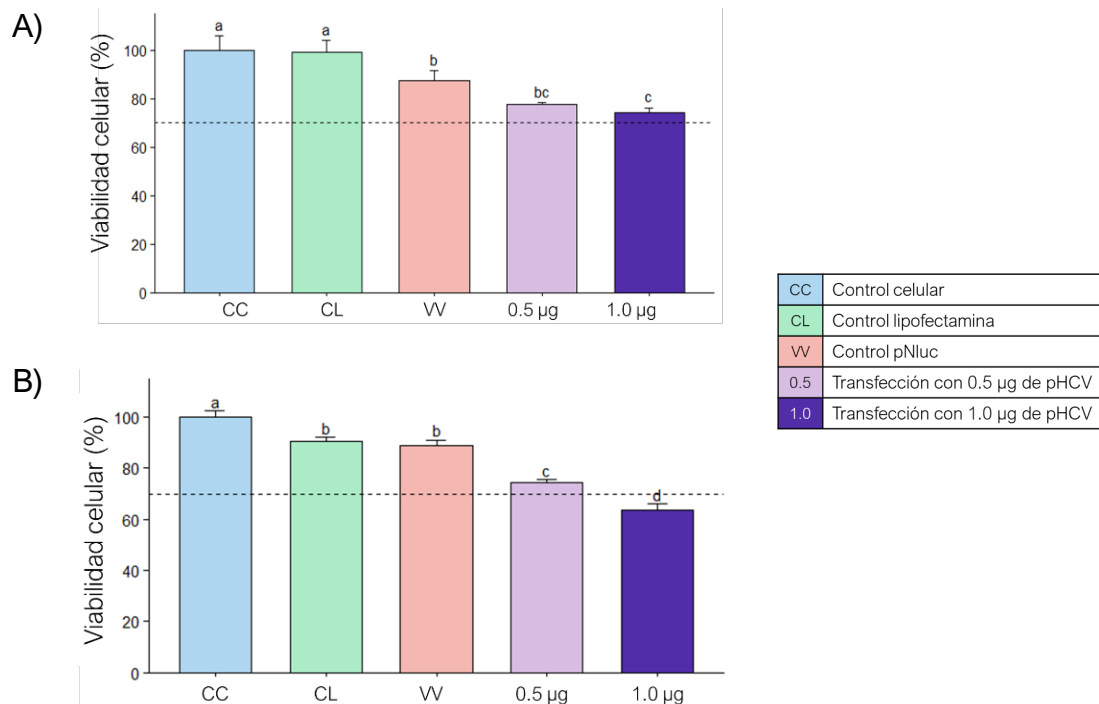


Gráfico 1. Viabilidad celular evaluada mediante ensayo CellTiter en células Huh-7 (a) y THLE-2 (b) a las 72 h post-transfección. La viabilidad se expresó como porcentaje relativo al control celular (CC), considerado como 100%. Los datos se presentan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey, donde las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

8.3. Transfección y su efecto en la citotoxicidad celular

De manera complementaria y consistente con los perfiles de viabilidad metabólica, se determinó el porcentaje de citotoxicidad celular relativa a las 72 horas post-transfección mediante la cuantificación de proteasa liberada debido a pérdida de integridad de la membrana plasmática. En la línea celular Huh-7, se constató un incremento gradual de la citotoxicidad acorde al aumento en la concentración del plásmido pHCV-T2A-NL. A pesar de este incremento estadísticamente significativo entre las dosis evaluadas, los niveles de daño celular se mantuvieron por debajo del umbral máximo de tolerancia del 30%, alcanzando un valor máximo cercano al 22% con la dosis de 1.0 μg (**Gráfico 2a**). Por el contrario, la línea THLE-2 exhibió una susceptibilidad notablemente superior frente al proceso de transfección. En estas células, la dosis de 0.5 μg incrementó la citotoxicidad de forma controlada, preservándose por debajo del límite crítico (**Gráfico 2b**). Sin embargo, la administración de la dosis máxima de 1.0 μg indujo niveles de citotoxicidad por encima del 35%, superando el umbral.

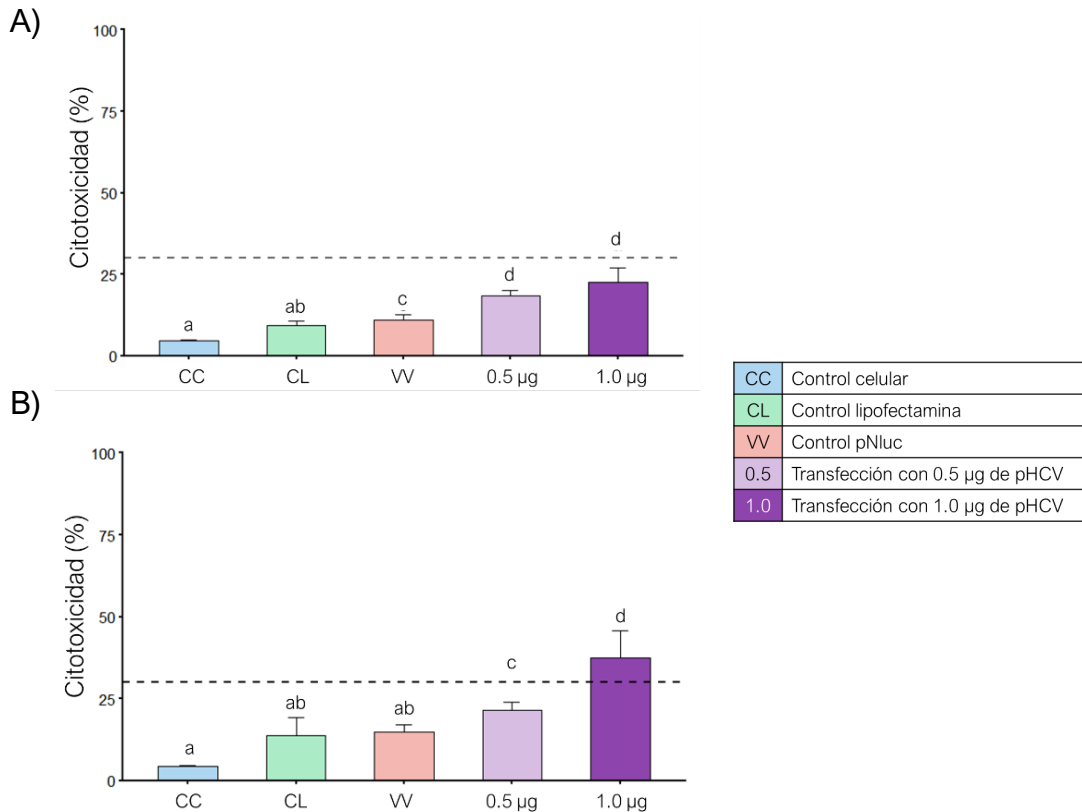


Gráfico 2. Citotoxicidad evaluada mediante ensayo CytoTox-Glo en células Huh-7 (a) y THLE-2 (b) a las 72 h post-transfección. Los valores representan el porcentaje de citotoxicidad relativo al control celular (CC) Los datos se presentan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey, donde las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

8.4. Expresión del constructo pHCV-T2A-NL a nivel transcripcional y traduccional

Con el objetivo de confirmar la transcripción exitosa del plásmido en los modelos celulares, se determinó el número de copias mediante RT-qPCR, amplificando específicamente una región del transcrito correspondiente a NS5A. Para lograr la cuantificación absoluta de las muestras, se construyó previamente una curva estándar a partir de diluciones seriadas del plásmido. El análisis de regresión lineal del ciclo umbral (Ct) frente al logaritmo en base 10 del número de copias demostró linealidad a lo largo del rango dinámico evaluado, obteniendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9981. A partir de la pendiente generada, se calculó una eficiencia de amplificación del 102.37%. La representación de la curva y la ecuación resultante ($y = -3.266x + 36.15$) empleada para la extrapolación de los Ct se detallan en el **Gráfico 3**.

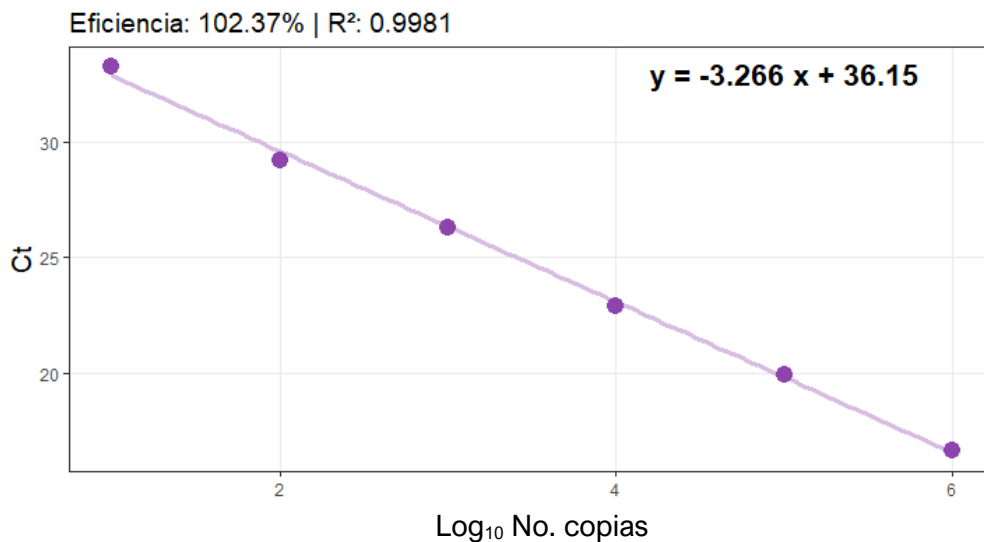


Gráfico 3. Curva estándar del plásmido pHCV-T2A-NL. La gráfica representa la relación inversamente proporcional entre el valor de Ct y el \log_{10} de la concentración del estándar. La línea de tendencia se determinó por regresión lineal.

Posteriormente, para asegurar que la señal detectada proviniera exclusivamente de la actividad transcripcional del constructo y no de un remanente del ADN plasmídico internalizado, el ARN extraído fue sometido a un tratamiento con DNasa previo a la retrotranscripción. La evaluación en la línea Huh-7 reveló una expresión transcripcional a las 72 horas post-transfección altamente significativa ($p \leq 0.0001$) en comparación con el control del vector vacío (**Gráfico 4**). Asimismo, la acumulación del transcrito aumentó de manera dosis-dependiente, a modo que el empleo de 0.5

μg de pHCV-T2A-NL generó una expresión de aproximadamente 1×10^4 copias de NS5A, mientras que el incremento a $1.0 \mu\text{g}$ elevó los niveles a cerca de 1×10^5 copias por nanogramo de ARN total, evidenciando una diferencia estadísticamente significativa entre ambas dosis ($p \leq 0.001$). De esta manera, se demostró que el constructo es transcripcionalmente activo.

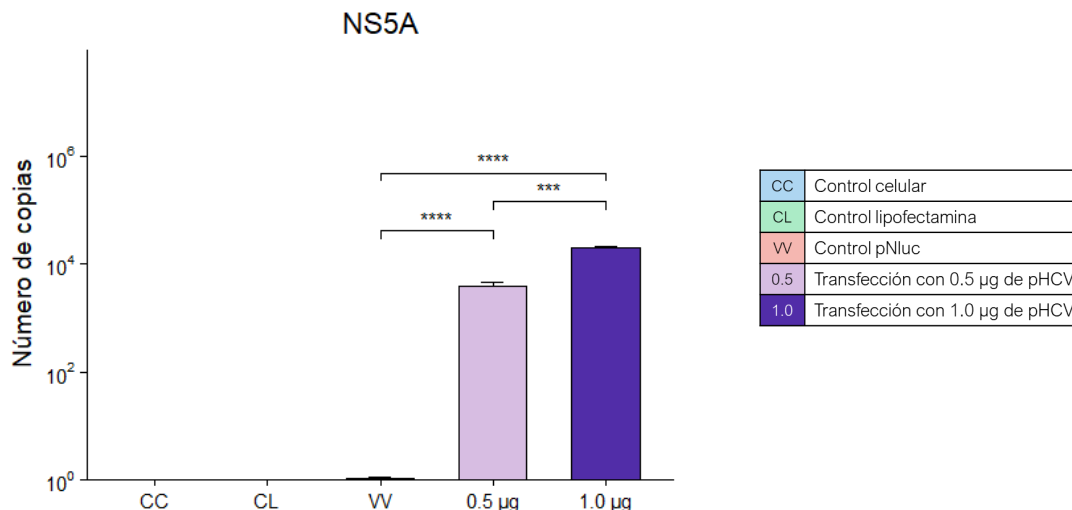


Gráfico 4. Expresión transcripcional de pHCV en células Huh-7 a las 72 h post-transfección, evaluada mediante el cálculo de No. de copias por RT-qPCR. Los niveles de ARN se normalizaron por nanogramo de ARN total. Las barras representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Prueba t de Student para muestras independientes. ***= $p \leq 0.001$, ****= $p \leq 0.0001$.

Continuando con la validación del sistema, el siguiente paso consistió en corroborar que el transcrito derivado del plásmido se tradujera eficazmente en una proteína funcional. Para este propósito, fue necesario extraer y estandarizar la concentración de proteína total de los lisados celulares mediante el ensayo colorimétrico de Bradford. Como paso preliminar para la cuantificación, se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar (**Gráfico 5**). El modelo de regresión lineal evidenció un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9984, asegurando la fiabilidad del ensayo para la interpolación de las muestras. Una vez asegurada la normalización de los extractos proteicos, se cuantificó la actividad de la enzima reportera NanoLuc, codificada dentro del mismo constructo. Tras la adición del sustrato furimazina, la enzima cataliza su oxidación, emitiendo una señal quimioluminiscente que es directamente proporcional a los niveles de proteína traducida.

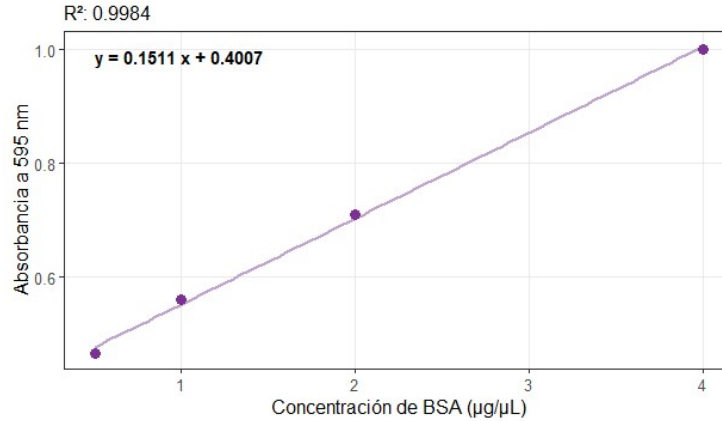


Gráfico 5. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford. Se empleó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para construir la curva en un rango de concentración de 0.5 a 4.0 µg/µL.

Como se observa en el **Gráfico 6**, se registró una actividad luminiscente estadísticamente significativa ($p \leq 0.0001$) en ambas líneas celulares tras la transfección con el plásmido pHCV-T2A-NL, así como con el vector control vacío que solo expresa la NanoLuc (pNluc), en comparación con los controles celulares basales. Particularmente, en las células Huh-7 se cuantificaron valores en el orden de 1×10^6 unidades relativas de luz (RLU) normalizadas por microgramo de proteína total. Por su parte, en las células THLE-2, la señal luminiscente se situó en un orden de magnitud menor, alcanzando niveles de 1×10^5 RLU/µg de proteína. Esta señal corrobora que, además de transcribirse eficientemente, el sistema reportero es traducido a una proteína funcional.

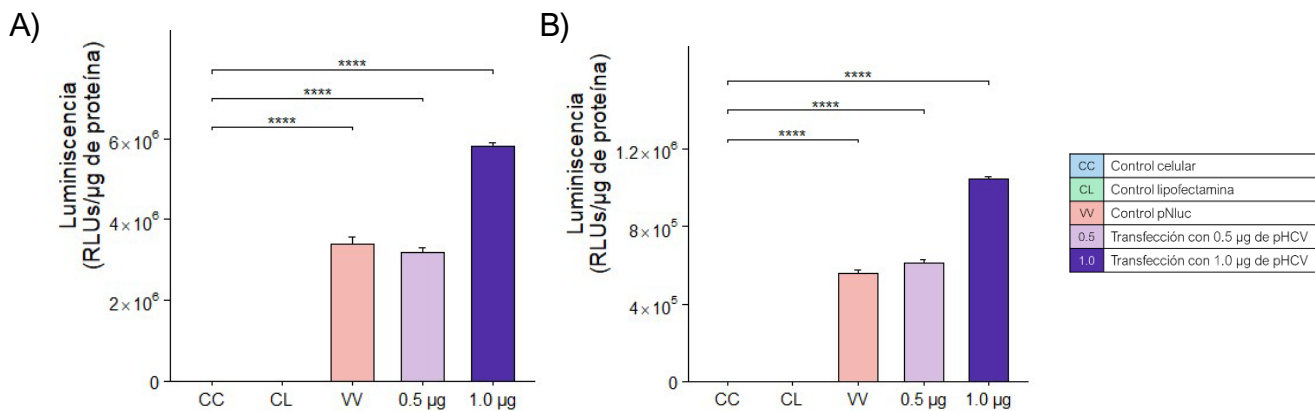


Gráfico 6. Actividad de NanoLuc normalizada por µg de proteína total en células Huh-7 (a) y THLE-2 (b) a las 72 h post-transfección. Las barras representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. ANOVA de una vía post-test de Dunnett, donde ****= $p \leq 0.0001$

Dado que el diseño del vector emplea un péptido T2A para inducir el salto ribosomal entre el gen reportero y la poliproteína viral, la actividad luminiscente representa un indicador indirecto de la traducción. Para confirmar la expresión y el procesamiento adecuado de las proteínas virales no estructurales, se procedió a realizar un análisis por Western Blot, el cual permitió la inmunodetección específica de las proteínas virales NS3 y NS5A del VHC, empleando la β -actina como control endógeno de carga para la normalización de la expresión.

En los lisados de las células Huh-7 transfectadas, se detectaron las bandas específicas correspondientes a NS3 (70 kDa) y NS5A (56 kDa). Al contrastar el peso molecular de estas bandas con el control positivo (células portadoras de un replicón subgenómico que expresan constitutivamente las proteínas virales), se corroboró que la poliproteína no solo se tradujo de forma exitosa, sino que fue procesada correctamente por las proteasas del sistema. El análisis por densitometría de las bandas reveló un incremento estadísticamente significativo en la expresión de ambas proteínas ($p \leq 0.0001$), mostrando una dependencia con la dosis del plásmido transfectado. Adicionalmente, el análisis de los niveles de expresión relativa denotó que la abundancia de la proteína NS3 es mayor que la de NS5A (**Gráfico 7**).

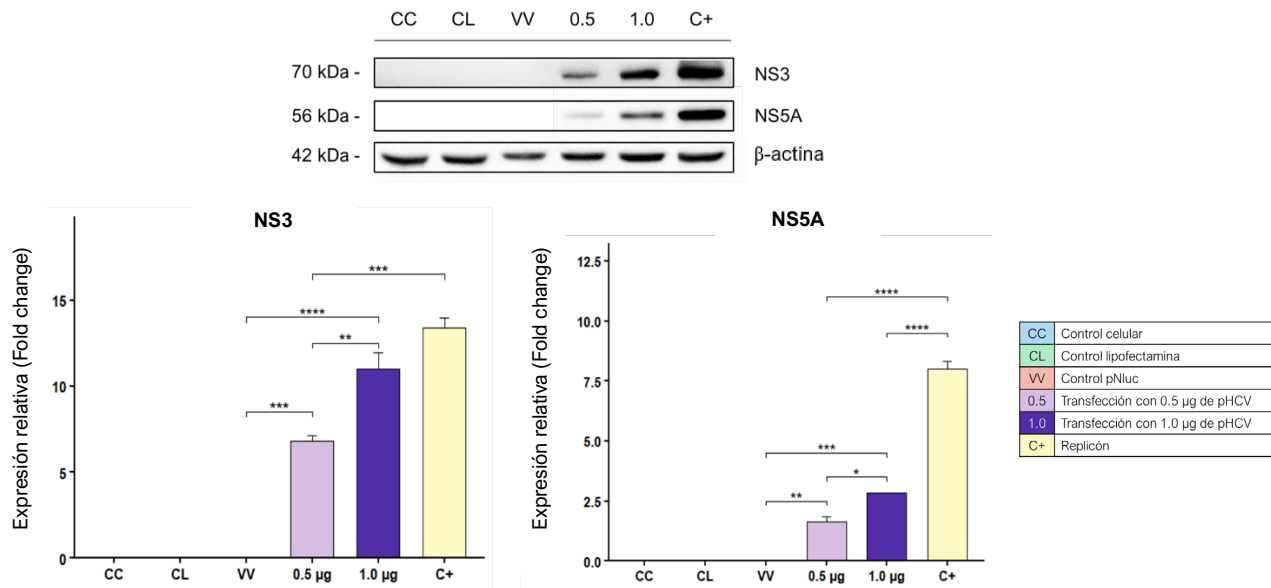


Gráfico 7. Expresión traduccional de las proteínas no estructurales NS3 y NS5A del VHC en células Huh-7 a las 72 h post-transfección, evaluada mediante Western Blot. Los resultados graficados representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía seguida de post-test de Tukey para comparaciones múltiples frente al vector vacío (VV), donde $*=p \leq 0.05$, $**=p \leq 0.01$, $***=p \leq 0.001$ y $****=p \leq 0.0001$.

De manera paralela, se evaluó el perfil de expresión traduccional en THLE-2. Al igual que en el modelo de hepatoma, la inmunodetección confirmó la presencia de las proteínas virales NS3 y NS5A en sus pesos moleculares esperados, validando que la escisión de la poliproteína ocurre en este sistema celular (**Gráfico 8**). El análisis densitométrico reveló un incremento significativo en la expresión de ambas proteínas frente al control del vector vacío.

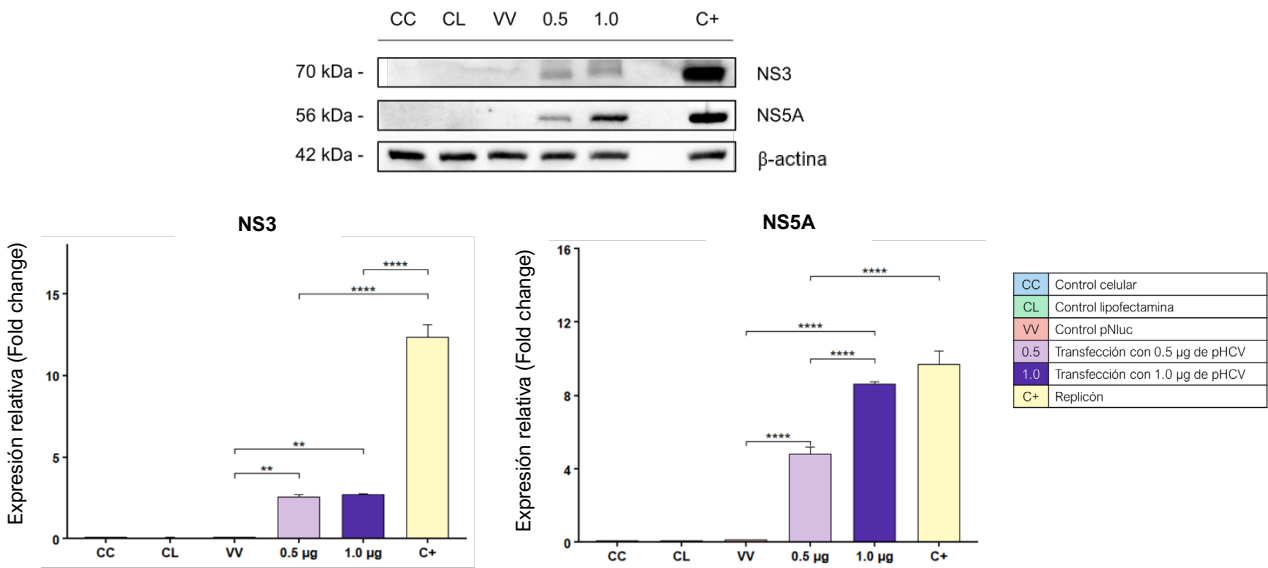


Gráfico 8. Expresión traduccional de las proteínas no estructurales NS3 y NS5A del VHC en células THLE-2 a las 72 h post-transfección, evaluada mediante Western Blot. Los resultados graficados representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía seguida de post-test de Tukey para comparaciones múltiples frente al vector vacío (VV), donde $**=p \leq 0.01$ y $****=p \leq 0.0001$.

Un hallazgo interesante fue la inversión en el patrón de abundancia relativa al contrastar ambos modelos. Mientras que en las células Huh-7 la acumulación de NS3 resultó predominante, en la línea THLE-2 se observó que la proteína NS5A es la que se expresa de manera más abundante. Como se aprecia en el Gráfico 6, los niveles de expresión relativa para NS5A alcanzaron valores cercanos a 5 y 9 para las dosis de 0.5 y 1.0 μ g, respectivamente, mostrando una marcada respuesta dosis-dependiente. En contraste, la expresión de NS3 se mantuvo en niveles más discretos, aproximadamente 2.5 veces sobre el control.

Para complementar estos hallazgos y validar cualitativamente la expresión íntegra de los extremos de la poliproteína viral, se realizó la inmunodetección de NS2 y NS5B, al tratarse de la primera y última proteína codificadas en la casete de expresión, respectivamente. Como se aprecia en la

Figura 9, se logró detectar la presencia de la proteína distal NS5B (66 kDa) a partir de la dosis de 0.5 µg, y de la proteína proximal NS2 (21 kDa) al incrementar la concentración del constructo a 2.0 µg. Si bien esta detección cualitativa no se sometió a un análisis densitométrico comparativo, permite corroborar que la maquinaria ribosomal completó la traducción de toda la secuencia insertada, y que el procesamiento proteolítico liberó con éxito el resto de los componentes del sistema.

En conjunto, estos resultados demuestran que el constructo pHCV-T2A-NL es transcrito, traducido y procesado de manera funcional, permitiendo la expresión robusta de las proteínas no estructurales del VHC tanto en el modelo de referencia Huh-7, como en el modelo de hepatocitos no tumorales THLE-2.

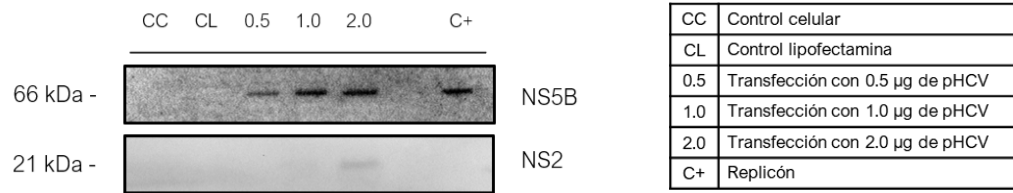


Figura 9. Detección cualitativa de las proteínas virales en los extremos de la poliproteína (NS2 y NS5B) en células Huh-7 a las 72 h post-transfección. Se evaluó la expresión mediante Western Blot utilizando dosis crecientes del plásmido pHCV-T2A-NL (0.5, 1.0 y 2.0 µg).

8.5. Caracterización funcional del estrés oxidativo inducido por pHCV-T2A-NL

Para abordar el último objetivo de este estudio, se llevó a cabo una a caracterización funcional del estrés oxidativo inducido por el constructo empleando la línea celular Huh-7 como modelo de referencia.

Se determinó el perfil de expresión diferencial de genes clave asociados a la respuesta al estrés celular mediante RT-qPCR a partir de ARN total. Específicamente, se cuantificaron los niveles de transcrito de las enzimas superóxido dismutasas (*SOD1* y *SOD2*), del factor de transcripción maestro regulador de la respuesta antioxidante (*NRF2*) y de un mediador clásico de estrés del retículo endoplásmico (*CHOP*), empleando el gen de la β -actina como control endógeno de normalización.

Como se detalla en el **Gráfico 9**, el análisis de *SOD1*, *SOD2* y *NRF2* no reveló alteraciones estadísticamente significativas tras la transfección con las distintas dosis del plásmido al compararlos con el grupo control del vector vacío (VV). Si bien la introducción del vector vacío pareció inducir un ligero incremento transcripcional en las superóxido dismutasas atribuible al propio estrés de la transfección, la expresión de las proteínas virales no exacerbó este efecto. Por el contrario, en las células transfectadas con el constructo viral, los niveles de *SOD1* y *SOD2* fluctuaron de manera comparable a los del control celular (CC). Por otro lado, la evaluación del gen *CHOP* mostró un patrón de expresión al alza dependiente de la dosis de plásmido transfectado. Si bien este incremento no alcanzó significancia estadística al contrastarlo directamente frente al vector vacío, sí presentó una diferencia significativa respecto al control celular basal. En conjunto, este patrón transcripcional sugiere que, bajo estas condiciones y tiempos de evaluación, la expresión transitoria de las proteínas no estructurales del VHC no tiene un efecto sobre la modulación de los genes relacionados al estrés oxidativo analizados.

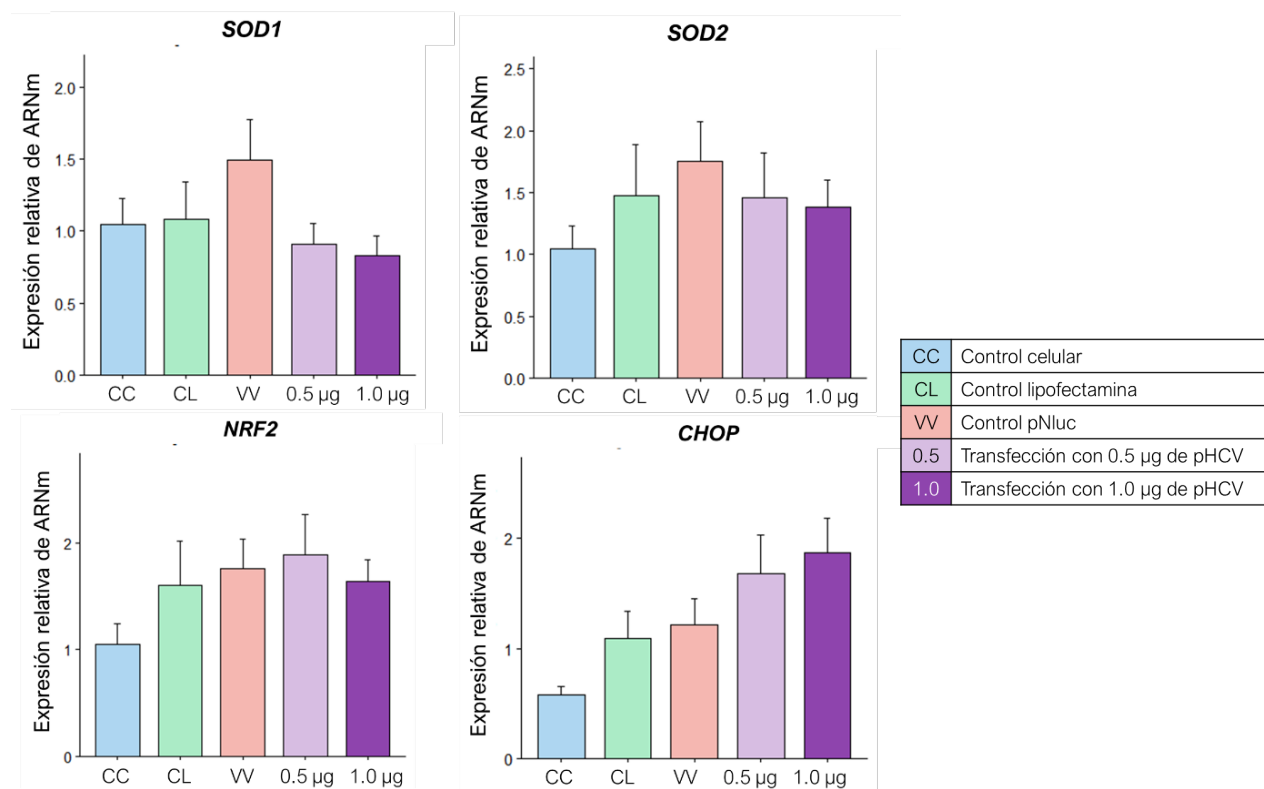


Gráfico 9. Expresión relativa de genes relacionados a estrés oxidativo en células Huh-7 a las 72 h post-transfección, evaluada mediante RT-qPCR. Normalización con β -actina. Los datos se presentan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Prueba de ANOVA de una vía seguida de post-test de Dunnett para comparaciones múltiples frente al vector vacío (VV).

Tras determinar que la expresión transitoria de las proteínas del VHC no modula significativamente el perfil transcripcional de los genes estudiados asociados al estrés oxidativo en las células Huh-7 a las 72 h, se procedió a evaluar directamente la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para ello, se empleó la sonda diclorofluoresceína (DCF), la cual permite detectar la acumulación de radicales como peróxidos o hidroxilos.

Como se aprecia en el **Gráfico 10**, la expresión de las proteínas virales induce un incremento significativo en la generación de ROS a las 72 horas post-transfección. Tanto el control de lipofectamina (CL) como el vector vacío (VV) mantuvieron una emisión de fluorescencia en niveles basales y comparables al control celular (CC). Por el contrario, la introducción del plásmido pHCV-T2A-NL detonó una acumulación de ROS dependiente de la dosis; se alcanzó aproximadamente un 165% de fluorescencia relativa con la dosis de 0.5 µg, y cerca del 200% de señal relativa al incrementar la concentración del constructo a 1.0 µg, ambos con una diferencia estadísticamente significativa frente al vector vacío ($p < 0.0001$). La funcionalidad del ensayo fue validada mediante un control positivo estimulado con peróxido de hidrógeno a 500 µM, el cual exhibió la máxima inducción de fluorescencia esperada.

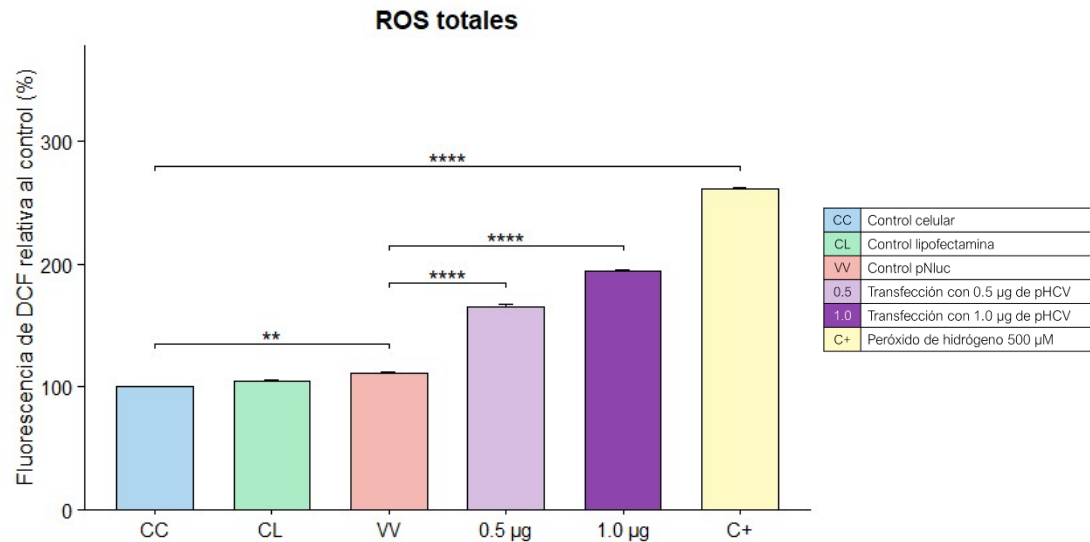


Gráfico 10. Determinación de ROS totales mediante fluorescencia de DCF en células Huh-7 a las 72 h post-transfección con pHCV. Los datos se presentan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Prueba de ANOVA de una vía seguida de post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples frente al vector vacío (VV). ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$

Para finalizar con la caracterización funcional y discriminar el origen subcelular del estrés oxidativo observado, se evaluaron los niveles de anión superóxido mitocondrial. Para ello, se empleó la sonda fluorescente MitoSOX Red, utilizando la tinción nuclear Hoechst 33342 para la posterior normalización por número de células.

Como se observa en el panel de micrografías representativas (**Figura 10**), la evaluación cualitativa evidenció un claro aumento en la intensidad de la señal correspondiente a la sonda en aquellas células transfectadas con las dosis de 0.5 y 1.0 μg del plásmido pHCV-T2A-NL. Este marcado incremento contrasta con la baja emisión observada en los controles basales (CC, CL y VV) y resulta congruente con el patrón de fluorescencia detectado en las células del control positivo, las cuales fueron sometidas a un tratamiento con peróxido de hidrógeno a 500 μM .

El análisis cuantitativo presentado en el **Gráfico 11** reveló que la transfección con la dosis de 1.0 μg del plásmido pHCV-T2A-NL indujo un aumento estadísticamente significativo en la acumulación de superóxido mitocondrial en comparación con el control del vector vacío (VV) ($p < 0.0001$). La magnitud de esta inducción alcanzó niveles de intensidad comparables a los del control positivo estimulado con peróxido de hidrógeno. Por su parte, la transfección con la dosis de 0.5 μg de pHCV también sugirió una tendencia al alza en la mediana de fluorescencia, aunque esta no resultó estadísticamente significativa. No obstante, resulta interesante notar que, bajo esta concentración de 0.5 μg , la asimetría en la distribución del gráfico de violín denota la presencia de distintas subpoblaciones celulares. Este perfil de dispersión sugiere la coexistencia de una fracción celular con alta emisión de fluorescencia y una población que se mantiene en niveles basales, un fenómeno inherente a la heterogeneidad de los ensayos de transfección transitoria.

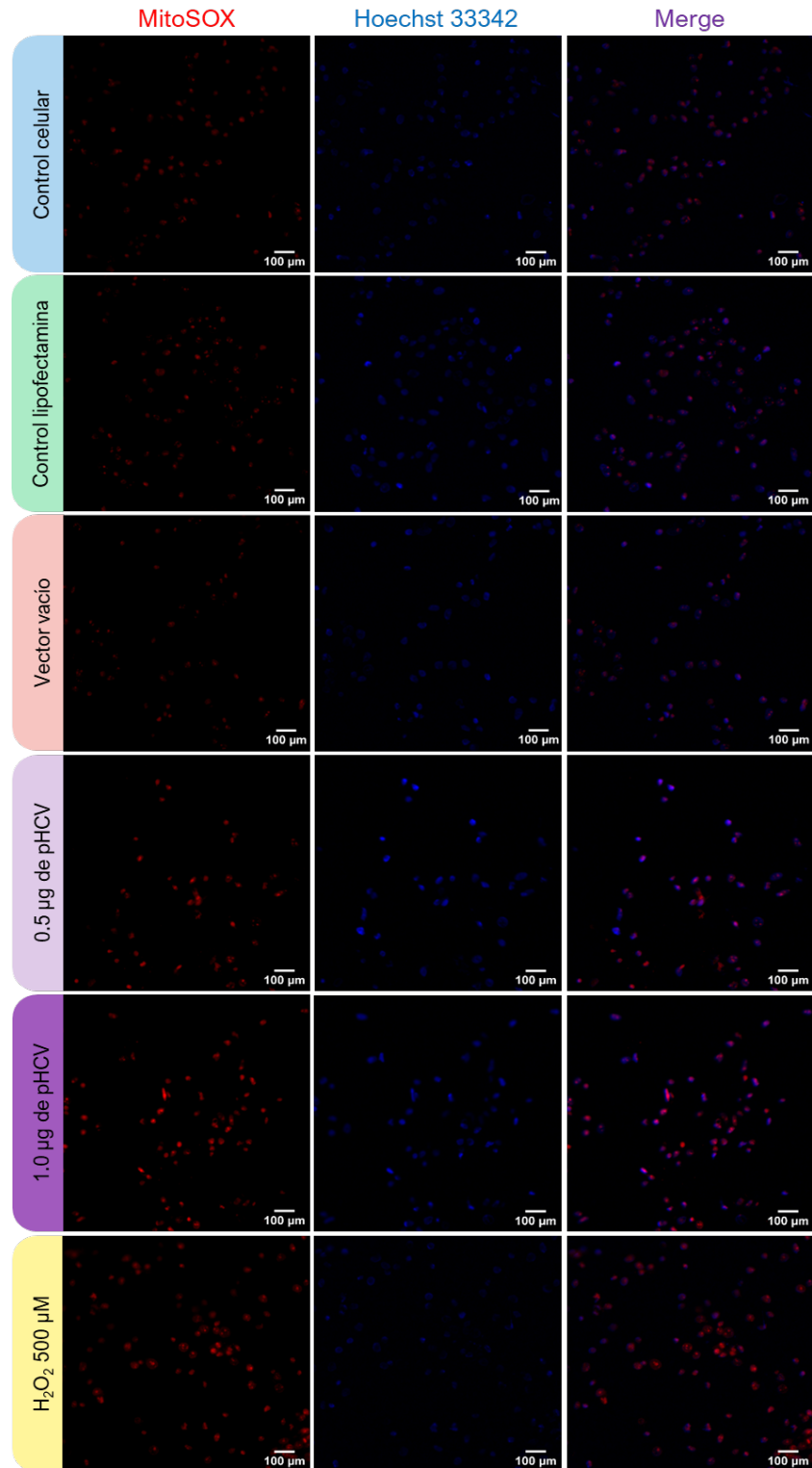


Figura 10. Evaluación de superóxido mitocondrial mediante fluorescencia de MitoSOX en células Huh-7 a las 72 h post-transfección con pHCV-T2A-NL. Paneles representativos que muestran la señal de MitoSOX Red (rojo), la tinción nuclear con Hoechst 33342 (azul) y la superposición de ambos canales (merge). Magnificación 20X. Barras de escala = 100 µm

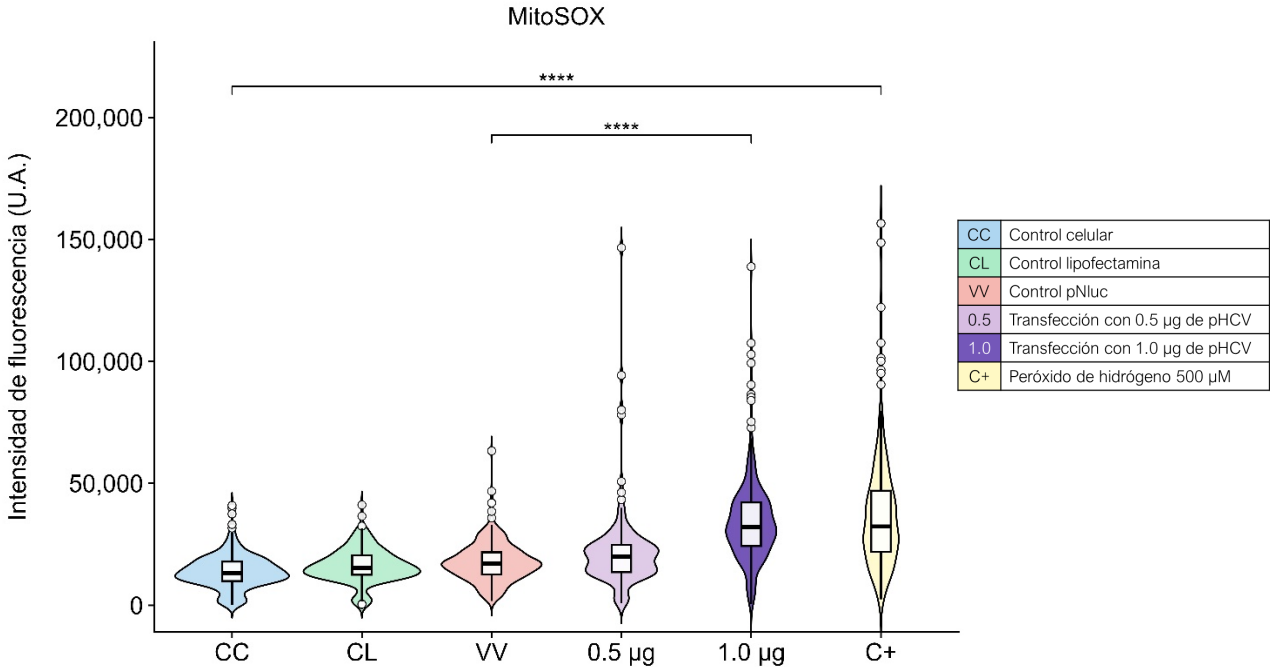


Gráfico 11. Determinación de superóxido mitocondrial mediante fluorescencia de MitoSOX en células Huh-7 a las 72 h post-transfección con pHCV. Normalización por número de núcleos teñidos con Hoechst 33342. Los datos se presentan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Prueba de Wilcoxon. **** $p \leq 0.0001$.

En conjunto, esta caracterización funcional demuestra que la expresión de las proteínas no estructurales del VHC induce un estado de estrés oxidativo, evidenciado por el incremento y la acumulación de especies reactivas de oxígeno totales y mitocondriales, y que este daño ocurre sin que exista una modulación compensatoria evidente en la expresión transcripcional de los principales genes del sistema antioxidante a las 72 horas de evaluación.

8. DISCUSIÓN

El estudio de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) ha dependido históricamente del uso de líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma, predominantemente Huh-7 y sus derivadas. Aunque este modelo ha sido fundamental para el entendimiento de la patogénesis viral, su origen tumoral intrínseco lo convierte en un sistema subóptimo. Las divergencias genómicas, transcriptómicas y metabólicas que presenta frente a un hepatocito primario imposibilitan dilucidar los verdaderos mecanismos tempranos de carcinogénesis y alteración celular mediados por el virus.

Las células Huh-7 albergan mutaciones en más de 50 genes asociados a la infección por VHC, incluyendo la pérdida de función en reguladores maestros de la homeostasis y supresión de tumores, como *TP53* (p53) y *ATM* (Kawamoto et al., 2020). Sumado a esto, exhiben una marcada activación de vías oncogénicas (MAPK/RAS/NF- κ B) y alteraciones en las respuestas al daño en el ADN (Nwosu et al., 2018; (Arzumanian et al., 2023). Este perfil aberrante impide evaluar cómo las proteínas virales, como NS5A, interactúan *de novo* con estas vías para inducir inestabilidad genómica. Otra limitante importante, es que el VHC es un virus altamente lipogénico que secuestra la maquinaria celular para su replicación. Sin embargo, evaluar este impacto en la línea Huh-7 resulta paradójico, ya que estas células poseen un fenotipo anabólico exacerbado y un metabolismo lipídico desregulado, impulsado por la inactivación de la fosfatasa *PTEN*, que hiperactiva constitutivamente la vía PI3K/AKT/mTOR. Además de sobreexpresar enzimas asociadas a la progresión tumoral (como HK2, PKM y FASN) y albergar mutaciones en reguladores de la autofagia y el estrés (como *ATG3*, *EIF2AK3* y *GPXI*), las células Huh-7 suprimen funciones metabólicas hepáticas primordiales, incluyendo la fosforilación oxidativa, el metabolismo del colesterol y la señalización PPAR, entre otros (Schicht et al., 2022). En consecuencia, el virus ingresa a un entorno donde el metabolismo energético que busca secuestrar ya se encuentra alterado por el efecto Warburg del cáncer. Esta reprogramación provoca que las Huh-7 fallen estructuralmente en reflejar los patrones basales de un hepatocito sano (Guo et al., 2011). Por lo tanto, el establecimiento de un modelo hepático no tumoral resulta necesario para aislar y dilucidar con precisión los mecanismos patogénicos inducidos por la expresión de las proteínas del virus de la hepatitis C, sin el sesgo de la línea tumoral. En este contexto, el presente trabajo evalúa la pertinencia biológica de la línea hepática no tumoral THLE-2 como una plataforma de expresión transitoria para las proteínas no estructurales del VHC, frente al modelo tumoral clásico.

Para evaluar el impacto de la expresión del sistema pHCV-T2A-NL, se comparó en primera instancia la viabilidad celular de las líneas THLE-2 y Huh-7 a las 72 horas mediante el ensayo metabólico de MTS, el cual mide la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales dependientes de NAD(P)H (como la succinato deshidrogenasa) para reducir la sal de tetrazolio a formazán (Sazonova et al., 2022). Se observó que en el modelo tumoral Huh-7 ambas concentraciones plasmídicas evaluadas (0.5 y 1.0 μg) lograron mantener la viabilidad por encima del umbral de aceptabilidad del 70%. En contraste, las células no tumorales THLE-2 exhibieron una susceptibilidad mayor, presentando una caída en la viabilidad que descendió por debajo de este umbral a la concentración máxima. Esta discrepancia puede atribuirse a la reprogramación metabólica de las células Huh-7. Se ha reportado que esta línea imita el perfil metabólico de los tumores hepáticos primarios correspondientes, a modo que reprograman su metabolismo para sobrealimentar el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) utilizando un consumo dual de glucosa y glutamina (Nwosu et al., 2018b). En consecuencia, la actividad basal de las deshidrogenasas mitocondriales en el modelo tumoral se encuentra hiperactivada, difiriendo del metabolismo fisiológico de un modelo no tumoral como THLE-2 lo que explica la aparente resiliencia en la viabilidad metabólica.

Para complementar este panorama y obtener una medida directa del daño celular independiente del sesgo metabólico, se utilizó el ensayo CytoTox-Glo. Al basarse en la pérdida de integridad de la membrana celular, este ensayo proporcionó una medida de la citotoxicidad relativa, revelando un efecto más marcado en las células THLE-2 frente a las Huh-7. Esta diferencia tiene su origen en el fenotipo maligno de las células Huh-7, las cuales exhiben una proliferación exacerbada y una marcada evasión de la apoptosis en comparación con los hepatocitos normales. Estudios han demostrado que esta resistencia a la muerte celular está impulsada por la desregulación de múltiples vías de supervivencia, específicamente por la sobreactivación de las cascadas de señalización JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT —esta última impulsada por la pérdida de *PTEN*—. Esto ocurre en conjunto con la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas clave como Bcl-xL, Mcl-1 y survivina (Fabregat, 2009); (He et al., 2021), la represión de efectores proapoptóticos como *BBC3* (PUMA) y caspasa-3, y la característica inactivación del gen supresor de tumores *TP53* (p53), el cual en células Huh-7 expresa la forma mutada Y220C, la cual es anormalmente estable, pero carece de actividad transcripcional (Zhang et al., 2019; Mitchell et al.,

2017). En consecuencia, estas alteraciones pudieran estar enmascarando el daño inducido por pHCV-T2A-NL, en comparación con lo observado en THLE-2.

La magnitud del efecto en la viabilidad de las células no tumorales subraya la pertinencia del diseño del vector pHCV-T2A-NL, pues se optó por evaluar de forma íntegra el efecto de las proteínas no estructurales del virus. En su mayoría, los estudios sobre la patogénesis celular del VHC emplean el sistema de replicón subgenómico clásico de Lohmann et al. (1999b), el cual abarca únicamente la región desde NS3 hasta NS5B. Esta aproximación omite a la proteína transmembranal NS2 bajo la premisa de que no es necesaria para la replicación *in vitro* del ARN genómico. No obstante, el uso de estos modelos truncados resulta metodológicamente limitante, ya que NS2 es un potente inductor de estrés celular y desregulación del ciclo proliferativo. Se ha reportado que la expresión de NS2 induce la fosforilación de eIF2 α y reduce la síntesis proteica *de novo*, desencadenando una cascada de estrés en el retículo endoplásmico caracterizada por la regulación al alza de GRP78, ATF6 y GADD153 (Von Dem Bussche et al., 2010). Simultáneamente, el extremo amino-terminal de NS2 ejerce una represión sobre múltiples promotores y elementos potenciadores celulares, contribuyendo a la alteración homeostática del hepatocito (Dumoulin et al., 2003). Aunado a esto, NS2 altera directamente el ciclo proliferativo al inducir un arresto en la fase S mediado por la disminución en la expresión de la ciclina A, lo cual inhibe el crecimiento de la célula infectada (Yang et al., 2006). En conjunto, esta evidencia muestra que la expresión ininterrumpida de todo el casete no estructural en el sistema pHCV-T2A-NL resulta necesario para recapitular las alteraciones metabólicas y el estrés celular derivados de la expresión de las proteínas virales.

Una vez establecido el efecto en la viabilidad y citotoxicidad celular, se procedió a la confirmación de la transcripción y traducción del sistema pHCV-T2A-NL, a las 72 horas post-transfección. La selección de este intervalo temporal se fundamenta en la dinámica de la infección temprana por el VHC. Estudios en hepatocitos humanos primarios han establecido que este punto constituye una fase crítica, marcando el periodo donde la célula hospedera experimenta la mayor reorganización de su transcriptoma en respuesta al estrés viral y ya muestra alteración de sus vías metabólicas, motivo por el cual se eligió este tiempo para los ensayos de este trabajo (Tegtmeyer et al., 2021).

Al evaluar si el constructo es traducido mediante la evaluación de la actividad de la enzima reportera NanoLuc, regida por el promotor constitutivo EF1 α , se determinó una marcada diferencia

entre ambos modelos celulares. En la línea tumoral Huh-7, la actividad luminiscente alcanzó valores en el orden de 1×10^6 RLU/ μ g, mientras que en las células no tumorales THLE-2, la señal se situó un orden de magnitud por debajo. Esta diferencia en la tasa de expresión proteica puede estar mediada por diversos mecanismos. A nivel transcripcional, la actividad del promotor del plásmido se ve fuertemente influenciada por el entorno tumoral. Estudios en líneas de hepatocarcinoma, incluyendo Huh-7 y HepG2, indican que los niveles de los factores de elongación endógenos eEF1A1 y eEF1A2 se encuentran significativamente incrementados en comparación con el tejido hepático normal (Grassi et al., 2007). Este hallazgo está respaldado por la elevación transcripcional masiva de *eEF1A1* documentada en múltiples muestras clínicas de tumores hepáticos (Zhang et al., 2018). En consecuencia, es probable que el promotor exógeno EF-1 α del sistema reportero sea hiperactivado en las células Huh-7. A nivel traduccional, la diferencia se magnifica por el estado del metabolismo anabólico de la célula hospedera. Las células Huh-7 exhiben una activación constitutiva de la vía PI3K/AKT/mTOR, impulsada por la pérdida de la fosfatasa PTEN. En este sentido, Schuster et al. (2015) demostraron una sobreexpresión de mTOR y una nula activación de sus reguladores inhibitorios en células de hepatocarcinoma al compararlas con hepatocitos humanos primarios. Asimismo, Kwon et al. (2016) corroboró que la vía mTOR se encuentra regulada al alza en diversos modelos de carcinoma hepatocelular para sostener la alta demanda proliferativa. Dado que el complejo mTORC1 opera como el regulador maestro de la síntesis proteica, controlando la biogénesis ribosómica y activando los factores de iniciación de la traducción, resulta esperable que la traducción del transcrito viral alcance niveles mayores en el modelo tumoral, difiriendo de lo observado en las células THLE-2 (Thoreen et al., 2012).

La detección de la señal quimioluminiscente de NanoLuc constituye un indicador directo y estequiométrico de la traducción de la poliproteína. Esto obedece al mecanismo de salto ribosómico (*ribosomal skipping*) inducido por el péptido T2A, el cual garantiza una síntesis co-traduccional en una relación equimolar 1:1 entre la enzima reportera y los componentes del VHC. En el diseño de constructos multicistronicos, se ha demostrado que el elemento T2A posee una eficiencia de escisión cercana al 100%. Esta característica supera las limitaciones de otros péptidos 2A o secuencias IRES, en los cuales la traducción del gen situado río abajo suele verse atenuada o ser ineficiente (Hadpech et al., 2018). No obstante, la validación mediante Western blot resultó indispensable, ya que permitió demostrar el procesamiento proteolítico correcto de la poliproteína

y la liberación de las proteínas virales individuales en sus pesos moleculares correspondientes. El análisis del perfil de expresión proteica determinó que la transfección de las líneas Huh-7 y THLE-2 con el plásmido pHCV-T2A-NL induce exitosamente la traducción y procesamiento de las proteínas del VHC, evidenciado por un aumento significativo y dependiente de la dosis frente a los controles celulares. La detección cualitativa de las proteínas presentes en los extremos del casete de expresión, NS2 y NS5B, corroboró que el transcrito viral es traducido en su totalidad sin truncamientos prematuros. Por su parte, el análisis densitométrico de NS3 y NS5A reveló un cambio notable en el patrón de acumulación relativa entre ambas líneas celulares: mientras que en el modelo tumoral Huh-7 la expresión de NS3 fue predominante, en los hepatocitos no tumorales THLE-2 se observó una acumulación mayoritaria de NS5A. Esta discrepancia evidencia que la abundancia intracelular de las proteínas del VHC no depende exclusivamente de su tasa de traducción, sino de mecanismos de regulación post-traduccionales específicos del entorno celular. Un factor crítico en esta regulación es la disponibilidad de chaperonas moleculares. Se ha demostrado que la estabilidad estructural y la maduración de la proteasa NS3 dependen estrechamente de su asociación física con la chaperona Hsp90 (Waxman et al., 2001). La inhibición o ausencia de este factor resulta en la rápida degradación proteasomal de NS3 y en la consecuente supresión de la replicación viral (Ujino et al., 2009); (Nakagawa et al., 2007). Esta dependencia cobra particular relevancia al considerar que la expresión de factores de choque térmico se encuentra alterada en contextos tumorales. Múltiples estudios independientes han corroborado que Hsp90 se encuentra regulada significativamente al alza en el carcinoma hepatocelular. Particularmente, Cheng et al. (2015) documentó una expresión positiva de Hsp90 en el 88.16% de los tejidos de hepatocarcinoma evaluados, en contraste con apenas un 16.67% de positividad en el tejido hepático normal. Esta sobreexpresión ha sido vinculada con estadios tumorales avanzados y un fenotipo proliferativo agresivo (Liu et al., 2016); (Chen et al., 2020). Por lo tanto, la acumulación predominante de NS3 en las células Huh-7 observada en el presente trabajo es consistente con un entorno tumoral que provee un exceso de Hsp90, el cual favorece la estabilidad proteica de la proteasa.

Una vez validada la expresión del sistema viral, el último objetivo de esta investigación consistió en la caracterización funcional del estrés oxidativo inducido por el constructo pHCV-T2A-NL en el modelo de referencia Huh-7. Es sabido que las proteínas no estructurales del VHC interactúan directamente con las membranas del retículo endoplásmico y la mitocondria, alterando la

homeostasis celular. Uno de los efectos documentados de esta interacción física es la disfunción de la cadena respiratoria y la consecuente exacerbación en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), fenómeno que suele acompañarse de una disminución global en la capacidad de respuesta antioxidante del hepatocito (Đorđević et al., 2021; Gravier-Hernández et al., 2020)

Para corroborar este efecto en nuestro modelo, se evaluó el perfil transcripcional de los genes *NRF2*, *SOD1*, *SOD2* y *CHOP* a las 72 horas post-transfección. Los resultados mostraron que la expresión génica de estos marcadores no presentó variaciones significativas al contrastarse con el vector vacío. Esta aparente ausencia de modulación transcripcional es congruente con los mecanismos de evasión del VHC y el diseño del sistema de expresión evaluado en este trabajo.

Particularmente, NRF2 (*NFE2L2*) actúa como el factor de transcripción maestro encargado de inducir la expresión de los genes citoprotectores. La literatura reporta que, aunque la infección induce la estabilización de NRF2 y su liberación del inhibidor citosólico Keap1, la transcripción de sus genes diana permanece fuertemente suprimida (Ivanov et al., 2011; Jiang et al., 2015). Mecánicamente, se ha demostrado que la proteasa NS3 provoca la deslocalización de las proteínas pequeñas Maf (sMaf), secuestrándolas en el citoplasma. Esto impide que NRF2 forme el heterodímero necesario para translocarse al núcleo y unirse a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) (Carvajal-Yepes et al., 2011). Este bloqueo en la vía de señalización se relaciona con la falta de inducción transcripcional observada en sus blancos principales: *SOD1*, la superóxido dismutasa citoplasmática dependiente de Cu/Zn, encargada de la defensa contra el anión superóxido, y *SOD2*, la superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de Mn, protectora de la cadena respiratoria. Cabe destacar que la respuesta de estas enzimas exhibe una dependencia del contexto celular. Mientras que estudios en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con infección crónica muestran una regulación al alza de *SOD2* como parte del estallido inmune antiviral, los modelos de origen hepatocelular exhiben de manera consistente una ausencia de cambios en su expresión génica (Larrea et al., 1998; Yalcin, et al. 2020); Karabulut, 2002) Estos hallazgos son respaldados por estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación utilizando el sistema de expresión genómica completa del VHC (cepa JFH-1), los cuales demostraron que *SOD2* no sufre variaciones transcripcionales y que la modulación a la baja de *SOD1* no ocurre a nivel de transcrito, sino a nivel traduccional (Merino-Mascorro, 2014). Finalmente, para evaluar el estrés del retículo endoplásmico (RE), se analizó la expresión de

CHOP (*DDIT3*), un factor de transcripción proapoptótico inducido clásicamente bajo condiciones de daño severo a través de la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). DeZwaan-McCabe et al. (2013) documentó la sobreexpresión significativa de *CHOP* en muestras hepáticas de pacientes con hepatocarcinoma avanzado y en modelos murinos sometidos a 12 semanas de agresión crónica, mientras que en ratones quiméricos SCID/Alb-uPA evaluados en etapas agudas, la infección por VHC no logró incrementar los niveles de *CHOP* en los hepatocitos, a pesar de evidenciarse una clara activación de otras proteínas de andamiaje y estrés del RE como BiP/GRP78 (Joyce et al., 2009). Estas discrepancias remarcan la dependencia del efecto mostrado con respecto al modelo experimental empleado.

Ante la ausencia de una respuesta transcripcional significativa en los genes antioxidantes y de estrés, se procedió a confirmar el desequilibrio redox de manera directa, cuantificando la producción de especies reactivas de oxígeno totales mediante la sonda DCF y evaluando específicamente la acumulación de anión superóxido mitocondrial mediante la sonda fluorescente MitoSOX Red. El incremento significativo en la producción de ROS corrobora que la expresión del constructo pHCV-T2A-NL induce un estrés oxidativo en las células a las 72 horas post-transfección con ambas dosis probadas del constructo. En cuanto a la producción de anión superóxido mitocondrial, esta fue significativa únicamente con la dosis de 1.0 µg del constructo, en tanto que la evaluación de la dosis de 0.5 µg reveló una distribución asimétrica en el gráfico de violín, denotando la coexistencia de una subpoblación celular con alta emisión de fluorescencia junto a otra en niveles basales; este perfil de dispersión demuestra la heterogeneidad biológica del estrés oxidativo evidenciada al analizar célula por célula, y no solo a la población celular en general.

Diversos estudios atribuyen la disfunción mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la infección por VHC a la actividad de las proteínas estructurales, en particular la proteína de la nucleocápside Core y la glicoproteína E1 (Ivanova et al., 2023; Zhang et al., 2023; Choi et al., 2014). Se ha documentado que la proteína Core estimula la actividad del uniportador de calcio mitocondrial y promueve la transcripción de las NADPH oxidasas (NOX1 y NOX4) de manera dependiente del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) lo cual resulta en una elevación persistente en la producción de anión superóxido (Ivanov et al., 2015; Choi et al., 2014). No obstante, los resultados observados con el vector pHCV-T2A-NL indican que la

expresión exclusiva de las proteínas no estructurales es suficiente para inducir un desequilibrio redox. En este sentido, se ha evidenciado que la proteína NS3 constituye un inductor directo de estrés oxidativo. Ensayos en monocitos humanos identificaron a NS3 como un activador principal de la enzima NADPH oxidasa en comparación con otras proteínas virales probadas individualmente. Este mecanismo requiere el influjo de calcio intracelular, así como la activación de quinasas de tirosina y la quinasa activada por estrés p38, lo que resulta en una liberación prolongada de radicales de oxígeno que contribuye a la disfunción celular y al daño en el ADN (Thorén et al., 2004; Machida et al., 2006; Christophe et al., 2001).

Por su parte, NS5A exhibe un efecto prooxidante a través de múltiples vías. Smirnova et al. (2016b) demostraron que NS5A induce la expresión de NOX1, NOX4 y del citocromo P450 2E1 mediante señalización mediada por TGF- β , de manera independiente a las alteraciones de calcio. Además, NS5A media un incremento directo en la producción de ROS a nivel mitocondrial, con la consecuente activación de la quinasa JNK (Deng et al., 2011; Jasey et al., 2019). Incluso, estudios comparativos *in vitro* reportan que la expresión de NS5A incrementa los niveles de ROS y especies reactivas de nitrógeno de forma más temprana que la proteína Core (García-Mediavilla et al., 2005).

Otro mecanismo que actúa como componente central en la patogénesis inducida por el VHC es la alteración de la dinámica de organelos. La proteína NS4B estimula la producción de ROS al perturbar la homeostasis del calcio intracelular. Este desequilibrio desencadena la vía de respuesta a la sobrecarga del retículo endoplásmico (EOR), promoviendo la activación posterior de vías de señalización como NF- κ B (Li et al., 2009; Kong et al., 2015). Por su parte, aunque NS4A no ha sido catalogado como un inductor directo de ROS, se ha demostrado que esta se acumula en las mitocondrias, causando el colapso del potencial transmembrana y la liberación de citocromo c, de modo que la alteración en la integridad mitocondrial facilita la fuga de electrones de la cadena respiratoria, contribuyendo a la generación del anión superóxido (Nomura-Takigawa et al., 2006).

La integración de la evidencia bibliográfica con los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia y cuantificación transcripcional demuestra que la región no estructural del VHC induce un estrés oxidativo significativo mediante la generación de ROS, particularmente superóxido, sin que se monte una respuesta antioxidante compensatoria del hospedero a nivel de transcripción de *NRF2*, *SOD1/2* y *CHOP*, a las 72 horas post-transfección con pHCV-T2A-NL.

9. CONCLUSIONES

1. Se estableció con éxito un modelo de expresión transitoria para las proteínas no estructurales del VHC (NS2-NS5B) mediante la transfección del plásmido pHCV en las líneas celulares Huh-7 y THLE-2.
2. El plásmido pHCV permitió la transcripción y traducción de las proteínas no estructurales del VHC tanto hepatocitos tumorales Huh-7, como en los no tumorales THLE-2.
3. Se determinó una susceptibilidad diferencial frente a la expresión del constructo viral; mientras que las células Huh-7 mantuvieron una viabilidad superior al 70%, los hepatocitos THLE-2 exhibieron una caída en la dosis máxima de plásmido transfectado a las 72 h.
4. La expresión de las proteínas del VHC indujo un estado de estrés oxidativo caracterizado por la acumulación dosis-dependiente de especies reactivas de oxígeno a las 72 h, en la línea Huh-7.
5. El incremento de estrés oxidativo no desencadenó una respuesta antioxidante compensatoria, observándose una falta de inducción en los genes de defensa (*NRF2*, *SOD1*, *SOD2*) y del mediador proapoptótico *CHOP* en comparación con el vector vacío, a las 72 h, en la línea Huh-7.

10. PERSPECTIVAS

Implementación del modelo THLE-2 para estudio de la transformación oncogénica mediada por el virus de la hepatitis C:

1. Identificar firmas persistentes post tratamiento con DAAs.
2. Caracterizar modificaciones epigenéticas tras la expresión transitoria de proteínas del VHC, que predispongan a la transformación maligna.
3. Determinar la dinámica de activación de vías de supervivencia aberrantes.
4. Evaluar el perfil bioenergético y la reprogramación metabólica en respuesta al pHCV-T2A-NL.
5. Analizar el secretoma de las células THLE-2 para la identificación de biomarcadores tempranos de daño hepático asociados a la expresión de pHCV-T2A-NL.

11. REFERENCIAS

- Alqahtani, S. A., & Sulkowski, M. S. (2019). The Role of Interferon for the Treatment of Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Topics in Medicinal Chemistry*, 31, 97–113. https://doi.org/10.1007/7355_2018_59
- Alshuwaykh, O., & Kwo, P. Y. (2020). HCV treatment in 2020: How to translate highly effective therapies into elimination strategies. *Hepatology Forum*, 1(2), 72–74. <https://doi.org/10.14744/HF.2020.2020.0009>,
- Anticoli, S., Amatore, D., Matarrese, P., De Angelis, M., Palamara, A. T., Nencioni, L., & Ruggieri, A. (2019). Counteraction of HCV-Induced Oxidative Stress Concurrs to Establish Chronic Infection in Liver Cell Cultures. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019(1), 6452390. <https://doi.org/10.1155/2019/6452390>
- Arzumanian, V., Pyatnitskiy, M., & Poverennaya, E. (2023). Comparative Transcriptomic Analysis of Three Common Liver Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8791. <https://doi.org/10.3390/IJMS24108791/S1>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014(1), 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Aydin, Y., Kurt, R., Tahan, V., & Daglilar, E. (2025). Chronic Hepatitis C in the Direct-Acting Antivirals Era: Carcinogenesis and Clinical Implications. *Diseases (Basel, Switzerland)*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/DISEASES13120393>
- Berggren, K. A., Suzuki, S., & Ploss, A. (2020). Animal Models Used in Hepatitis C Virus Research. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 3869, 21(11), 3869. <https://doi.org/10.3390/IJMS21113869>
- Bhattacharya, D., Aronsohn, A., Price, J., Lo Re, V., Panel, the A. A. for the S. of L. D. D. S. of A. H. G., Heald, J., Demisashi, G., Durzy, E., Davis-Owino, A., & Tynes, S. (2023). Hepatitis C Guidance 2023 Update: American Association for the Study of Liver Diseases– Infectious Diseases Society of America Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAD319>
- Boguszewska-Mańkowska, D., Zagdańska, M. N. and B., Boguszewska-Mańkowska, D., & Zagdańska, M. N. and B. (2015). Protein Oxidation and Redox Regulation of Proteolysis. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. <https://doi.org/10.5772/61182>
- Bukh, J. (2012). Animal Models for the Study of Hepatitis C Virus Infection and Related Liver Disease. *Gastroenterology*, 142(6), 1279-1287.e3. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2012.02.016>
- Burm, R., Collignon, L., Mesalam, A. A., & Meuleman, P. (2018). Animal models to study hepatitis C virus infection. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 369043. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01032/FULL>

- Carvajal-Yepes, M., Himmelsbach, K., Schaedler, S., Ploen, D., Krause, J., Ludwig, L., Weiss, T., Klingel, K., & Hildt, E. (2011). Hepatitis C virus impairs the induction of cytoprotective Nrf2 target genes by delocalization of small maf proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 8941–8951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186684>
- Chan, S. W., & Egan, P. A. (2009). Effects of hepatitis C virus envelope glycoprotein unfolded protein response activation on translation and transcription. *Archives of Virology* 2009 154:10, 154(10), 1631–1640. <https://doi.org/10.1007/S00705-009-0495-5>
- Chen, W., Li, G., Peng, J., Dai, W., Su, Q., & He, Y. (2020). Transcriptomic analysis reveals that heat shock protein 90 α is a potential diagnostic and prognostic biomarker for cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 29(4), 357–364. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000549>
- Cheng, W., Ainiwaer, A., Xiao, L., Cao, Q., Wu, G., Yang, Y., Mao, R., & Bao, Y. (2015). Role of the novel HSP90 inhibitor AUY922 in hepatocellular carcinoma: Potential for therapy. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 2451–2456. <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.3725/ABSTRACT>
- Choi, J., Corder, N. L. B., Koduru, B., & Wang, Y. (2014). Oxidative stress and hepatic Nox proteins in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 267–284. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2014.04.020>
- Christophe, B., Bernad, J., Chaouche, N., Orfila, C., Boraud, M., Alric, L., Pipy, B., & Vinel, J.-P. (2001). Non-structural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *Journal of Hepatology*, 34, 109. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)81266-6](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)81266-6)
- 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., Manekarn, N., Lin, W., & Chung, R. T. (2016). HCV induces transforming growth factor β 1 through activation of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 22487-. <https://doi.org/10.1038/srep22487>
- Colpitts, C. C., Tsai, P. L., & Zeisel, M. B. (2020). Hepatitis C Virus Entry: An Intriguingly Complex and Highly Regulated Process. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 2091, 21(6), 2091. <https://doi.org/10.3390/IJMS21062091>
- DebRoy, S., Hiraga, N., Imamura, M., Hayes, C. N., Akamatsu, S., Canini, L., Perelson, A. S., Pohl, R. T., Persiani, S., Uprichard, S. L., Tateno, C., Dahari, H., & Chayama, K. (2016a). HCV dynamics and cellular gene expression in uPA-SCID chimeric mice with humanized livers during intravenous silibinin monotherapy. *Journal of Viral Hepatitis*, 23(9), 708. <https://doi.org/10.1111/JVH.12551>
- DebRoy, S., Hiraga, N., Imamura, M., Hayes, C. N., Akamatsu, S., Canini, L., Perelson, A. S., Pohl, R. T., Persiani, S., Uprichard, S. L., Tateno, C., Dahari, H., & Chayama, K. (2016b). HCV dynamics and cellular gene expression in uPA-SCID chimeric mice with humanized livers during intravenous silibinin monotherapy. *Journal of Viral Hepatitis*, 23(9), 708. <https://doi.org/10.1111/JVH.12551>

- Deng, L., Shoji, I., Ogawa, W., Kaneda, S., Soga, T., Jiang, D., Ide, Y.-H., & Hotta, H. (2011). Hepatitis C Virus Infection Promotes Hepatic Gluconeogenesis through an NS5A-Mediated, FoxO1-Dependent Pathway. *Journal of Virology*, 85(17), 8556–8568. <https://doi.org/10.1128/JVI.00146-11>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:JVI;ISSUE:ISSUE:DOI
- DeZwaan-McCabe, D., Riordan, J. D., Arensdorf, A. M., Icardi, M. S., Dupuy, A. J., & Rutkowski, D. T. (2013). The Stress-Regulated Transcription Factor CHOP Promotes Hepatic Inflammatory Gene Expression, Fibrosis, and Oncogenesis. *PLOS Genetics*, 9(12), e1003937. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003937>
- Di Marco, L., Cannova, S., Ferrigno, E., Landro, G., Nonni, R., Mantia, C. La, Cartabellotta, F., Calvaruso, V., & Di Marco, V. (2025). A Comprehensive Review of Antiviral Therapy for Hepatitis C: The Long Journey from Interferon to Pan-Genotypic Direct-Acting Antivirals (DAAs). *Viruses*, 17(2), 163. <https://doi.org/10.3390/V17020163>
- Dorđević, V., Stanković Dorđević, D., Kocić, B., Dinić, M., Sokolović, D., & Pešić Stanković, J. (2021). The Impact of Hepatitis C Virus Genotypes on Oxidative Stress Markers and Catalase Activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 6676057. <https://doi.org/10.1155/2021/6676057>
- Dumoulin, F. L., Von Dem Bussche, A., Li, J., Khamzina, L., Wands, J. R., Sauerbruch, T., & Spengler, U. (2003). Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*, 305(2), 260–266. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1701>
- Endale, H. T., Tesfaye, W., & Mengstie, T. A. (2023). ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1226044. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2023.1226044/TEXT>
- Fabregat, I. (2009). Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology*, 15(5), 513–520. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.513>
- Feld, J. J., Jacobson, I. M., Hézode, C., Asselah, T., Ruane, P. J., Gruener, N., Abergel, A., Mangia, A., Lai, C.-L., Chan, H. L. Y., Mazzotta, F., Moreno, C., Yoshida, E., Shafran, S. D., Towner, W. J., Tran, T. T., McNally, J., Osinusi, A., Svarovskaia, E., ... Zeuzem, S. (2015). Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection. *New England Journal of Medicine*, 373(27), 2599–2607. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1512610>;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION
- Foquet, L., Wilson, E. M., Verhoye, L., Grompe, M., Leroux-Roels, G., Bial, J., & Meuleman, P. (2017). Successful engraftment of human hepatocytes in uPA- SCID and FRG® KO mice. *Methods in Molecular Biology*, 1506, 117–130. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6506-9_8/SAVE-RESEARCH
- Fu, N., Yao, H., Nan, Y., & Qiao, L. (2016). Role of Oxidative Stress in Hepatitis C Virus Induced Hepatocellular Carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, 17(6), 498–504. <https://doi.org/10.2174/1568009616666160926124043>
- García-Mediavilla, M. V., Sánchez-Campos, S., González-Pérez, P., Gómez-Gonzalo, M., Majano, P. L., López-Cabrera, M., Clemente, G., García-Monzón, C., & González-Gallego, J. (2005).

- Differential contribution of hepatitis C virus NS5A and core proteins to the induction of oxidative and nitrosative stress in human hepatocyte-derived cells. *Journal of Hepatology*, 43(4), 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.04.019>
- Garg, S., Brooks, J. T., Luo, Q., & Skarbinski, J. (2014). 1588: Prevalence of and Factors Associated with Hepatitis C Virus Testing and Infection Among HIV-infected Adults Receiving Medical Care in the United States. *Open Forum Infectious Diseases*, 1(Suppl 1), S423. <https://doi.org/10.1093/OFID/OFU052.1134>
- Graille, M., Wild, P., Sauvain, J. J., Hemmendinger, M., Canu, I. G., & Hopf, N. B. (2020). Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 3743, 21(11), 3743. <https://doi.org/10.3390/IJMS21113743>
- Grassi, G., Scaggiante, B., Farra, R., Dapas, B., Agostini, F., Baiz, D., Rosso, N., & Tiribelli, C. (2007). The expression levels of the translational factors eEF1A 1/2 correlate with cell growth but not apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines with different differentiation grade. *Biochimie*, 89(12), 1544–1552. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2007.07.007>
- Gravier-Hernández, R., Gil-del Valle, L., Valdes-Alonso, L., Hernández-Ayala, N., Bermúdez-Alfonso, Y., Hernández-Requejo, D., Rosell-Guerra, T., & Hernández-González-Abreu, M. C. (2020). Oxidative stress in hepatitis C virus–human immunodeficiency virus co-infected patients. *Annals of Hepatology*, 19(1), 92–98. <https://doi.org/10.1016/J.AOHEP.2019.05.009>
- Gullberg, R. C., Jordan Steel, J., Moon, S. L., Soltani, E., & Geiss, B. J. (2014). Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology*, 475, 219. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.10.037>
- Guo, L., Dial, S., Shi, L., Branham, W., Liu, J., Fang, J. L., Green, B., Deng, H., Kaput, J., & Ning, B. (2011). Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 39(3), 528–538. <https://doi.org/10.1124/DMD.110.035873>
- Gupta, P. (2013). Hepatitis C Virus and HIV Type 1 Co-Infection. *Infectious Disease Reports*, 5(Suppl 1), e7. <https://doi.org/10.4081/IDR.2013.S1.E7>
- Hadpech, S., Jinathep, W., Saoin, S., Thongkum, W., Chupradit, K., Yasamut, U., Moonmuang, S., & Tayapiwatana, C. (2018). Impairment of a membrane-targeting protein translated from a downstream gene of a “self-cleaving” T2A peptide conjunction. *Protein Expression and Purification*, 150, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.05.002>
- He, J., Wang, Z., Hao, G., & Cui, X. (2021). Aberrant expression of PI3K/AKT signaling is involved in apoptosis resistance of hepatocellular carcinoma. *Open Life Sciences*, 16(1), 1037. <https://doi.org/10.1515/BIOL-2021-0101>
- Hernandez, M. D., & Sherman, K. E. (2011). HIV/HCV Coinfection Natural History and Disease Progression, A Review of The Most Recent Literature. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 6(6), 478. <https://doi.org/10.1097/COH.0B013E32834BD365>

- Hino, K., Nishina, S., Sasaki, K., & Hara, Y. (2019). Mitochondrial damage and iron metabolic dysregulation in hepatitis C virus infection. *Free Radical Biology and Medicine*, *133*, 193–199. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.09.044>
- Hu, T., Wang, J., Li, W., Liu, M., Han, N., Yuan, M., Du, L., & Tang, H. (2022). Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infection. *Viruses* *2022*, Vol. *14*, Page 2630, *14*(12), 2630. <https://doi.org/10.3390/V14122630>
- Ito, M., Sun, S., Fukuhara, T., Suzuki, R., Tamai, M., Yamauchi, T., Nakashima, K., Tagawa, Y. ichi, Okazaki, S., Matsuura, Y., Wakita, T., & Suzuki, T. (2017). Development of hepatoma-derived, bidirectional oval-like cells as a model to study host interactions with hepatitis C virus during differentiation. *Oncotarget*, *8*(33), 53899. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19108>
- Ivanov, A. V., Smirnova, O. A., Ivanova, O. N., Masalova, O. V., Kochetkov, S. N., & Isaguliants, M. G. (2011). Hepatitis C Virus Proteins Activate NRF2/ARE Pathway by Distinct ROS-Dependent and Independent Mechanisms in HUH7 Cells. *PLOS ONE*, *6*(9), e24957. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0024957>
- Ivanov, A. V., Smirnova, O. A., Petrushanko, I. Y., Ivanova, O. N., Karpenko, I. L., Alekseeva, E., Sominskaya, I., Makarov, A. A., Bartosch, B., Kochetkov, S. N., & Isaguliants, M. G. (2015). HCV Core Protein Uses Multiple Mechanisms to Induce Oxidative Stress in Human Hepatoma Huh7 Cells. *Viruses* *2015*, Vol. *7*, Pages 2745-2770, *7*(6), 2745–2770. <https://doi.org/10.3390/V7062745>
- Ivanova, O. N., Krasnov, G. S., Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Fedorov, V. S., Zakirova, N. F., Golikov, M. V., Kochetkov, S. N., Bartosch, B., Valuev-Elliston, V. T., & Ivanov, A. V. (2023). Transcriptome Analysis of Redox Systems and Polyamine Metabolic Pathway in Hepatoma and Non-Tumor Hepatocyte-like Cells. *Biomolecules*, *13*(4), 714. <https://doi.org/10.3390/BIOM13040714/S1>
- Jassey, A., Liu, C. H., Changou, C. A., Richardson, C. D., Hsu, H. Y., & Lin, L. T. (2019). Hepatitis C Virus Non-Structural Protein 5A (NS5A) Disrupts Mitochondrial Dynamics and Induces Mitophagy. *Cells* *2019*, Vol. *8*, Page 290, *8*(4), 290. <https://doi.org/10.3390/CELLS8040290>
- Jiang, Y., Bao, H., Ge, Y., Tang, W., Cheng, D., Luo, K., Gong, G., & Gong, R. (2015). Therapeutic targeting of GSK3 β enhances the Nrf2 antioxidant response and confers hepatic cytoprotection in hepatitis C. *Gut*, *64*(1), 168–179. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2013-306043>
- Joyce, M. A., Walters, K. A., Lamb, S. E., Yeh, M. M., Zhu, L. F., Kneteman, N., Doyle, J. S., Katze, M. G., & Tyrrell, D. L. (2009). HCV Induces Oxidative and ER Stress, and Sensitizes Infected Cells to Apoptosis in SCID/Alb-uPA Mice. *PLOS Pathogens*, *5*(2), e1000291. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000291>
- Kalantari, L., Ghotbabadi, Z. R., Gholipour, A., Ehymayed, H. M., Najafiyan, B., Amirlou, P., Yasamineh, S., Gholizadeh, O., & Emtiazi, N. (2023). A state-of-the-art review on the NRF2 in Hepatitis virus-associated liver cancer. *Cell Communication and Signaling* *2023* *21:1*, *21*(1), 318-. <https://doi.org/10.1186/S12964-023-01351-6>

- Kanwal, F., Kramer, J., Asch, S. M., Chayanupatkul, M., Cao, Y., & El-Serag, H. B. (2017). Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology*, *153*(4), 996-1005.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.06.012>
- Karabulut, A. (2002). A Comparison of Erythrocyte Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Patients With Hepatitis C Infection. *Turkish Journal of Medical Sciences*.
- Karunatileke, N. C., Fast, C. S., Ngo, V., Brickenden, A., Duennwald, M. L., Konermann, L., & Choy, W. Y. (2021). Nrf2, the major regulator of the cellular oxidative stress response, is partially disordered. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(14), 7434. <https://doi.org/10.3390/IJMS22147434/S1>
- Kato, N., Mori, K., Abe, K. ichi, Dansako, H., Kuroki, M., Ariumi, Y., Wakita, T., & Ikeda, M. (2009). Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Research*, *146*(1–2), 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2009.08.006>
- Kawamoto, M., Yamaji, T., Saito, K., Shirasago, Y., Satomura, K., Endo, T., Fukasawa, M., Hanada, K., & Osada, N. (2020). Identification of Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell Lines. *Frontiers in Genetics*, *11*, 546106. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.546106/TEXT>
- Kayesh, M. E. H., Kohara, M., & Tsukiyama-Kohara, K. (2025). Effects of oxidative stress on viral infections: an overview. *Npj Viruses* *2025* *3*:1, *3*(1), 27-. <https://doi.org/10.1038/s44298-025-00110-3>
- Kim, S. J., Syed, G. H., & Siddiqui, A. (2013). Hepatitis C Virus Induces the Mitochondrial Translocation of Parkin and Subsequent Mitophagy. *PLOS Pathogens*, *9*(3), e1003285. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003285>
- Kinhale, S. P., & Khyade, V. B. (2019). Protein Peroxidation: The Covalent Modification of Protein Induced Through Reactive Oxygen Species (ROS) and With Secondary By-products of Oxidative Stress. *International Journal of Chemical Separation Technology*, *5*(2), 1–25. <https://doi.org/10.37628/JCST.V5I2.864>
- Kong, L., Li, S., Huang, M., Xiong, Y., Zhang, Q., Ye, L., Liu, J., Zhu, X., Sun, R., & Guo, Y. (2015). The Roles of Endoplasmic Reticulum Overload Response Induced by HCV and NS4B Protein in Human Hepatocyte Viability and Virus Replication. *PLOS ONE*, *10*(4), e0123190. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123190>
- Kunden, R. D., Khan, J. Q., Ghezelbash, S., & Wilson, J. A. (2020). The Role of the Liver-Specific microRNA, miRNA-122 in the HCV Replication Cycle. *International Journal of Molecular Sciences* *2020*, Vol. *21*, Page 5677, *21*(16), 5677. <https://doi.org/10.3390/IJMS21165677>
- Kwon, S., Jeon, J. S., Ahn, C., Sung, J. S., & Choi, I. (2016). Rapamycin regulates the proliferation of Huh7, a hepatocellular carcinoma cell line, by up-regulating p53 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *479*(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.09.035>
- Larrea, E., Beloqui, O., Muñoz-Navas, M. A., Civeira, M. P., & Prieto, J. (1998). Superoxide Dismutase in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Free Radical Biology and Medicine*, *24*(7–8), 1235–1241. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00437-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00437-1)

- Li, S., Ye, L., Yu, X., Xu, B., Li, K., Zhu, X., Liu, H., Wu, X., & Kong, L. (2009). Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF- κ B activation. *Virology*, 391(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2009.06.039>
- Liu, X., Chen, S., Tu, J., Cai, W., & Xu, Q. (2016). HSP90 inhibits apoptosis and promotes growth by regulating HIF-1 abundance in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(3), 825–835. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2016.2482/ABSTRACT>
- Lohmann, V., & Bartenschlager, R. (2013). On the History of Hepatitis C Virus Cell Culture Systems. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(5), 1627–1642. <https://doi.org/10.1021/JM401401N>
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L., & Bartenschlager, R. (1999a). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285(5424), 110–113. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5424.110>
- Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L., & Bartenschlager, R. (1999b). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285(5424), 110–113. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5424.110>
- Lowey, B., & Li, Q. (2018). Hepatitis C Virus Infection of Cultured Cells and Primary Human Hepatocytes. *Current Protocols in Cell Biology*, 80(1), e54. <https://doi.org/10.1002/CPCB.54>
- Lozano-Sepulveda, S. A., Bryan-Marrugo, O. L., Cordova-Fletes, C., Gutierrez-Ruiz, M. C., & Rivas-Estilla, A. M. (2015). Oxidative stress modulation in hepatitis C virus infected cells. *World Journal of Hepatology*, 7(29), 2880–2889. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i29.2880>
- MacArthur, K. L., Wu, C. H., & Wu, G. Y. (2012). Animal models for the study of hepatitis C virus infection and replication. *World Journal of Gastroenterology*, 18(23), 2909–2913. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i23.2909>
- Machida, K., Cheng, K. T.-H., Lai, C.-K., Jeng, K.-S., Sung, V. M.-H., & Lai, M. M. C. (2006). Hepatitis C Virus Triggers Mitochondrial Permeability Transition with Production of Reactive Oxygen Species, Leading to DNA Damage and STAT3 Activation. *Journal of Virology*, 80(14), 7199–7207. <https://doi.org/10.1128/JVI.00321-06>; WEBSITE: WEBSITE: ASMJ; ISSUE: ISSUE: DOI
- Mari, M., de Gregorio, E., de Dios, C., Roca-Agujetas, V., Cucarull, B., Tutusaus, A., Morales, A., & Colell, A. (2020). Mitochondrial Glutathione: Recent Insights and Role in Disease. *Antioxidants 2020, Vol. 9, Page 909*, 9(10), 909. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9100909>
- Mccartney, E. M., Helbig, K. J., Narayana, S. K., Eyre, N. S., Aloia, A. L., & Beard, M. R. (2013). Signal transducer and activator of transcription 3 is a proviral host factor for hepatitis C virus. *Hepatology*, 58(5), 1558–1568. <https://doi.org/10.1002/HEP.26496>
- Medvedev, R., Ploen, D., Spengler, C., Elgner, F., Ren, H., Bunten, S., & Hildt, E. (2017). HCV-induced oxidative stress by inhibition of Nrf2 triggers autophagy and favors release of viral particles. *Free Radical Biology and Medicine*, 110, 300–315. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.06.021>

- Merino-Mascorro, J. (2014). *Estudio de la participación de la superóxido dismutasa (SOD) en la regulación de la replicación del virus de la hepatitis C (VHC)*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Mitchell, J. K., Midkiff, B. R., Israelow, B., Evans, M. J., Lanford, R. E., Walker, C. M., Lemon, S. M., & McGiverna, D. R. (2017). Hepatitis C Virus indirectly disrupts DNA damage-induced p53 responses by activating protein kinase R. *MBio*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00121-17>
- Mohamadi, M., Azarbayjani, K., Mozhgani, S. H., Bamdad, T., Alamdary, A., Nikoo, H. R., Hashempour, T., Hedayat Yaghoobi, M., & Ajorloo, M. (2020). Hepatitis C virus alternative reading frame protein (ARFP): Production, features, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(12), 2930–2937. <https://doi.org/10.1002/JMV.26091>; JOURNAL: JOURNAL:10969071; WGROUP: STRING: PUBLICATION
- Mohamed Alou-El-Makarem, M., Madany Moustafa, M., Abdel-Aziz Fahmy, M., Mohamed Abdel-Hamed, A., Nagy El-fayomy, K., & Mohamed Abdel-Salam Darwish, M. (2014). *Evaluation of Carbonylated Proteins in Hepatitis C Virus Patients*. <https://doi.org/10.4172/2329-6798.1000130>
- Ms, Y., Gulesci N, Bilgin R, & Is, K. (n.d.). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in patients with viral hepatitis C. *Research Article Integrative Molecular Medicine*, 7, 2020. <https://doi.org/10.15761/IMM.1000397>
- Na, S. K., & Song, B. C. (2019). Development and surveillance of hepatocellular carcinoma in patients with sustained virologic response after antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Clinical and Molecular Hepatology*, 25(3), 234–244. <https://doi.org/10.3350/CMH.2018.0108>
- Nakagawa, S. ichiro, Umehara, T., Matsuda, C., Kuge, S., Sudoh, M., & Kohara, M. (2007). Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(4), 882–888. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.12.117>
- Narbus, C. M., Israelow, B., Sourisseau, M., Michta, M. L., Hopcraft, S. E., Zeiner, G. M., & Evans, M. J. (2011). HepG2 Cells Expressing MicroRNA miR-122 Support the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle. *Journal of Virology*, 85(22), 12087. <https://doi.org/10.1128/JVI.05843-11>
- Ngo, V., & Duennwald, M. L. (2022). Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants 2022, Vol. 11, Page 2345*, 11(12), 2345. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11122345>
- Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K., & Hotta, H. (2006). Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *Journal of General Virology*, 87(7), 1935–1945. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.81701-0/CITE/REFWORKS>
- Nwosu, Z. C., Battello, N., Rothley, M., Piorońska, W., Sitek, B., Ebert, M. P., Hofmann, U., Sleeman, J., Wölfl, S., Meyer, C., Megger, D. A., & Dooley, S. (2018a). Liver cancer cell

- lines distinctly mimic the metabolic gene expression pattern of the corresponding human tumours. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 37(1), 211. <https://doi.org/10.1186/S13046-018-0872-6>
- Nwosu, Z. C., Battello, N., Rothley, M., Piorońska, W., Sitek, B., Ebert, M. P., Hofmann, U., Sleeman, J., Wöfl, S., Meyer, C., Megger, D. A., & Dooley, S. (2018b). Liver cancer cell lines distinctly mimic the metabolic gene expression pattern of the corresponding human tumours. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2018 37:1, 37(1), 211-. <https://doi.org/10.1186/S13046-018-0872-6>
- Omura, H., Liu, F., Shimakami, T., Murai, K., Shirasaki, T., Kitabayashi, J., Funaki, M., Nishikawa, T., Nakai, R., Sumiyadorj, A., Hayashi, T., Yamashita, T., Honda, M., & Kaneko, S. (2019). Establishment and Characterization of a New Cell Line Permissive for Hepatitis C Virus Infection. *Scientific Reports*, 9(1), 7943. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-44257-5>
- Operskalski, E. A., & Kovacs, A. (2011). HIV/HCV Co-infection: Pathogenesis, Clinical Complications, Treatment, and New Therapeutic Technologies. *Current HIV/AIDS Reports*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1007/S11904-010-0071-3>
- Pal, S., Polyak, S. J., Bano, N., Qiu, W. C., Carithers, R. L., Shuhart, M., Gretch, D. R., & Das, A. (2010). Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25(3), 627. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1746.2009.06128.X>
- Pawlotsky, J. M., Negro, F., Aghemo, A., Berenguer, M., Dalgard, O., Dusheiko, G., Marra, F., Puoti, M., & Wedemeyer, H. (2020). EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *Journal of Hepatology*, 73(5), 1170–1218. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.018>
- Pearlman, B. L., & Hinds, A. E. (2018). Review article: novel antivirals for hepatitis C—sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir, glecaprevir/pibrentasvir. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 48(9), 914–923. <https://doi.org/10.1111/APT.14977>;ISSUE:ISSUE:DOI
- Ploss, A., & Kapoor, A. (2020). Animal Models of Hepatitis C Virus Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(5), a036970. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A036970>
- Porrás-Ramírez, A., & Rico-Mendoza, A. (2020). Coinfection of Hepatitis B and C in HIV Patients: A Review of the State of the Art. *Hepatitis B and C*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.83704>
- Qiu, Z., Zou, K., Zhuang, L., Qin, J., Li, H., Li, C., Zhang, Z., Chen, X., Cen, J., Meng, Z., Zhang, H., Li, Y., & Hui, L. (2016). Hepatocellular carcinoma cell lines retain the genomic and transcriptomic landscapes of primary human cancers. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 27411-. <https://doi.org/10.1038/srep27411>
- Quarato, G., Scrima, R., Agriesti, F., Moradpour, D., Capitanio, N., & Piccoli, C. (2013). Targeting mitochondria in the infection strategy of the hepatitis C virus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(1), 156–166. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2012.06.008>

- Ramana, K. V., Srivastava, S., & Singhal, S. S. (2013). Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013(1), 583438. <https://doi.org/10.1155/2013/583438>
- Ramirez, S., & Bukh, J. (2018). Current status and future development of infectious cell-culture models for the major genotypes of hepatitis C virus: Essential tools in testing of antivirals and emerging vaccine strategies. *Antiviral Research*, 158, 264–287. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2018.07.014>
- Sainz, B., Barretto, N., Yu, X., Corcoran, P., & Uprichard, S. L. (2011). *Permissiveness of human hepatoma cell lines for HCV infection*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-30>
- Samrat, S. K., Li, W., Singh, S., Kumar, R., & Agrawal, B. (2014). Alternate Reading Frame Protein (F Protein) of Hepatitis C Virus: Paradoxical Effects of Activation and Apoptosis on Human Dendritic Cells Lead to Stimulation of T Cells. *PLOS ONE*, 9(1), e86567. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0086567>
- Sander, W. J., Fourie, C., Sabiu, S., O'Neill, F. H., Pohl, C. H., & O'Neill, H. G. (2022). Reactive oxygen species as potential antiviral targets. *Rev. Med. Virol.*, 32(1), e2240. <https://doi.org/10.1002/rmv.2240>
- Sazonova, E. V., Chesnokov, M. S., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2022). Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. *Cell Death Discovery* 2022 8:1, 8(1), 417-. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01207-x>
- Schicht, G., Seidemann, L., Haensel, R., Seehofer, D., & Damm, G. (2022). Critical Investigation of the Usability of Hepatoma Cell Lines HepG2 and Huh7 as Models for the Metabolic Representation of Resectable Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 14(17), 4227. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14174227/S1>
- Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., Gebhardt, R., Weiss, T. S., Kiess, W., & Garten, A. (2015). FK866-induced NAMPT inhibition activates AMPK and downregulates mTOR signaling in hepatocarcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(2), 334–340. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.01.111>
- Shapatava, E., Nelson, K. E., Tsertsvadze, T., & Rio, C. del. (2006). Risk behaviors and HIV, hepatitis B, and hepatitis C seroprevalence among injection drug users in Georgia. *Drug and Alcohol Dependence*, 82(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0376-8716\(06\)80006-2](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(06)80006-2)
- Sidorkiewicz, M., & Brown, R. J. (2021). Hepatitis C Virus Uses Host Lipids to Its Own Advantage. *Metabolites* 2021, Vol. 11, Page 273, 11(5), 273. <https://doi.org/10.3390/METABO11050273>
- Smirnova, O. A., Ivanova, O. N., Bartosch, B., Valuev-Elliston, V. T., Mukhtarov, F., Kochetkov, S. N., & Ivanov, A. V. (2016a). Hepatitis C Virus NS5A Protein Triggers Oxidative Stress by Inducing NADPH Oxidases 1 and 4 and Cytochrome P450 2E1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 8341937. <https://doi.org/10.1155/2016/8341937>
- Smirnova, O. A., Ivanova, O. N., Bartosch, B., Valuev-Elliston, V. T., Mukhtarov, F., Kochetkov, S. N., & Ivanov, A. V. (2016b). Hepatitis C Virus NS5A Protein Triggers Oxidative Stress by

- Inducing NADPH Oxidases 1 and 4 and Cytochrome P450 2E1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 8341937. <https://doi.org/10.1155/2016/8341937>
- Stroffolini, T., & Stroffolini, G. (2024). Prevalence and Modes of Transmission of Hepatitis C Virus Infection: A Historical Worldwide Review. *Viruses* 2024, Vol. 16, Page 1115, 16(7), 1115. <https://doi.org/10.3390/V16071115>
- Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z. Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019(1), 5080843. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Tabatabavakili, S., Aleyadeh, W., Cerrocchi, O., Janssen, H. L. A., Hansen, B. E., Bogoch, I. I., & Feld, J. J. (2022). Incidence of Hepatitis C Virus Infections Among Users of Human Immunodeficiency Virus Pre-exposure Prophylaxis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 20(3), 674–681. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.03.006>
- Tanaka, H., Fujita, N., Sugimoto, R., Urawa, N., Horiike, S., Kobayashi, Y., Iwasa, M., Ma, N., Kawanishi, S., Watanabe, S., Kaito, M., & Takei, Y. (2008). Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *British Journal of Cancer* 2008 98:3, 98(3), 580–586. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604204>
- Tardif, K. D., Mori, K., & Siddiqui, A. (2002). Hepatitis C Virus Subgenomic Replicons Induce Endoplasmic Reticulum Stress Activating an Intracellular Signaling Pathway. *Journal of Virology*, 76(15), 7453–7459. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.15.7453-7459.2002>;CTYPE:STRING:JOURNAL
- Tegtmeier, 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., & 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), e00245-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00245-21>
- Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, 485(7396), 109. <https://doi.org/10.1038/NATURE11083>
- Thorén, F., Romero, A., Lindh, M., Dahlgren, C., & Hellstrand, K. (2004). A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(6), 1180–1186. <https://doi.org/10.1189/JLB.0704387>
- Toyoda, H. (2022). Sofosbuvir/velpatasvir and glecaprevir/pibrentasvir: how should we choose among these two latest and probably the last regimens? *Hepatology Research*, 52(10), 815–816. <https://doi.org/10.1111/HEPR.13828>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:1872034X;ISSUE:ISSUE:DOI

- Ujino, S., Yamaguchi, S., Shimotohno, K., & Takaku, H. (2009). Heat-shock Protein 90 Is Essential for Stabilization of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein NS3. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(11), 6841. <https://doi.org/10.1074/JBC.M806452200>
- Van De Laar, T. J. W., Van Der Bij, A. K., Prins, M., Bruisten, S. M., Brinkman, K., Ruys, T. A., Van Der Meer, J. T. M., De Vries, H. J. C., Mulder, J. W., Van Agtmael, M., Jurriaans, S., Wolthers, K. C., & Coutinho, R. A. (2007). Increase in HCV Incidence among Men Who Have Sex with Men in Amsterdam Most Likely Caused by Sexual Transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(2), 230–238. <https://doi.org/10.1086/518796>
- Von Dem Bussche, A., MacHida, R., Li, K., Loevinsohn, G., Khander, A., Wang, J., Wakita, T., Wands, J. R., & Li, J. (2010). Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *Journal of Hepatology*, 53(5), 797–804. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2010.05.022>
- Wang, T., & Weinman, S. A. (2013). Interactions Between Hepatitis C Virus and Mitochondria: Impact on Pathogenesis and Innate Immunity. *Current Pathobiology Reports*, 1(3), 179. <https://doi.org/10.1007/S40139-013-0024-9>
- Waxman, L., Whitney, M., Pollok, B. A., Kuo, L. C., & Darke, P. L. (2001). Host cell factor requirement for hepatitis C virus enzyme maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13931. <https://doi.org/10.1073/PNAS.241510898>
- Wei, D., Li, N. L., Zeng, Y., Liu, B., Kumthip, K., Wang, T. T., Huo, D., Ingels, J. F., Lu, L., Shang, J., & Li, K. (2016). The molecular chaperone grp78 contributes to toll-like receptor 3-mediated innate immune response to hepatitis c virus in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 291(23), 12294–12309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.711598>
- Wisniewska, M. J., Wencel, A., Jakubowska, M., Motyl, J. A., Dudek, K., Burzynska, B., Pijanowska, D. G., & Pluta, K. D. (2025). Variable expression of hepatic genes in different liver tumor cell lines: conclusions for drug testing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 13, 1646602. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2025.1646602/TEXT>
- Xie, C., & Singal, A. K. (2025). Beyond the Cure: Navigating Hepatocellular Risk and Surveillance after Hepatitis C Eradication in the Direct-acting Antiviral Era. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 13(5), 418–424. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2024.00499>
- Yang, X. J., Liu, J., Ye, L., Liao, Q. J., Wu, J. G., Gao, J. R., She, Y. L., Wu, Z. H., & Ye, L. B. (2006). HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression. *Virus Research*, 121(2), 134–143. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2006.02.004>
- Zhang, C., Yu, Y., Huang, Q., & Tang, K. (2019). SIRT6 regulates the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma via the ERK1/2 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 1575–1582. <https://doi.org/10.3892/MMR.2019.10398>
- Zhang, S., Li, X., Zheng, Y., Liu, J., Hu, H., Zhang, S., & Kuang, W. (2023). Single cell and bulk transcriptome analysis identified oxidative stress response-related features of Hepatocellular

Carcinoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1191074.
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2023.1191074/FULL>

Zhang, W., Xiang, M., Zheng, C., Chen, L., Ge, J., Yan, C., & Liu, X. (2018). [Eukaryotic translation elongation factor 1A1 positively regulates NOB1 expression to promote invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells in vitro]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University*, 38(10), 1195–1202.
<https://doi.org/10.3969/J.ISSN.1673-4254.2018.10.07>

Zhao, Y., Chen, Y., Hu, Y., Wang, J., Xie, X., He, G., Chen, H., Shao, Q., Zeng, H., & Zhang, H. (2018). Genomic alterations across six hepatocellular carcinoma cell lines by panel-based sequencing. *Translational Cancer Research*, 7(2), 231–239.
<https://doi.org/10.21037/TCR.2018.02.14>

12. ANEXOS

MATERIALES

- Micropipetas automáticas de volumen variable.
- Puntillas para micropipetas.
- Pipetas serológicas.
- Tubos cónicos eppendorf.
- Gradillas.
- Cámara de Neubauer.
- Frascos de cultivo celular T-25 y T-75 (Corning).
- Recipiente de enfriamiento para criopreservación Mr. Frosty (Thermo Scientific).
- Crioviales.
- Tubos falcon de 15 y 50 mL.
- Placas de 96 pozos blancas de fondo plano (Corning).
- Placas de 96 pozos negras de fondo plano para cultivo celular (Corning).
- Placas de 96 pozos transparentes de fondo plano (Corning).
- Placas de 6 pozos transparentes de fondo plano (Corning).
- Pipetores automáticos.
- Tiras de 8 tubos de reacción MicroAmp de 0.2 mL (Applied Biosystems).
- Tapas ópticas en tira para tubos MicroAmp (Applied Biosystems).
- Raspadores celulares (NEST).
- Barras magnéticas de agitación.
- Congelantes.
- Membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (0.45 μm).
- Papel filtro para transferencia (Bio-Rad).
- Esponjas para transferencia (Bio-Rad).
- Placas de vidrio para geles de poliacrilamida (Bio-Rad).
- Peines para geles de poliacrilamida (Bio-Rad).
- Pissetas.
- Pinzas.
- Jeringas y agujas hipodérmicas (21G, 0.8 mm).
- Filtros de jeringa de 0.22 μm .

EQUIPOS

- Contador automatizado de células Countess 3 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).
- Cabina de bioseguridad Clase II Tipo A2 (Labconco Corporation).
- Centrífuga compacta Z 206 A (Hermle).
- Microscopio invertido (Leica Microsystems).
- Incubadora de CO₂ DuraFlow (NuAire, Inc.).
- Agitador orbital (LabGenius, Daigger Scientific).
- Centrífuga refrigerada Biofuge Primo R (Heraeus, Thermo Fisher Scientific).
- Termociclador de 96 pocillos Veriti (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).
- QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).
- Microcentrífuga MiniSpin plus (Eppendorf).
- Mini incubadora (Labnet International, Inc.).
- Centrífuga refrigerada Sorvall ST 16R (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific).
- Cabina de PCR (Biobase Biodustry Co.).
- Placa de calentamiento y agitación (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific).
- ChemiDoc™ (Bio-Rad).
- Bomba de vacío.
- Microscopio invertido de epifluorescencia Eclipse Ts2-FL.

PROTOCOLOS DE CULTIVO CELULAR

- **Descongelamiento y sembrado de la línea celular THLE-2.**

1. Sumergir los crioviales con células en baño María a 37 °C hasta su descongelamiento.
2. Transferir el contenido del vial a un tubo con 9.0 mL de medio BEBM suplementado.
3. Centrifugar a 125 × g durante 5 minutos para eliminar el DMSO.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en medio completo fresco.
5. Sembrar las células en un frasco de cultivo de 75 cm² previamente tratado con 0.01 mg/mL de fibronectina, 0.03 mg/mL de colágeno bovino tipo I y 0.01 mg/mL de albúmina de suero bovina disueltos en medio BEBM.
6. Incubar a 37 °C con 5% de CO₂.
7. Observar al microscopio 12 horas después para verificar la adhesión celular.

- **Descongelamiento y sembrado de la línea celular Huh-7.**

1. Retirar los crioviales del congelador de -80°C o del nitrógeno líquido.
2. Sumergir los crioviales en baño de agua a 37°C hasta su descongelamiento.
3. Transferir el contenido del vial a un frasco de cultivo de 25 cm² previamente acondicionado con 5 mL de medio completo ADMEM suplementado.
4. Incubar las células a 37°C con 5% de CO₂.
5. Observar al microscopio 12 horas después para verificar la adhesión celular.
6. Realizar un lavado previo con 3 mL de PBS 1X.
7. Hacer un cambio de medio a las 24 horas para eliminar el DMSO y el detrito celular, reemplazándolo por medio completo fresco.

- **Cambio de medio**

1. Retirar el medio agotado por aspiración.
2. Agregar medio completo fresco preacondicionado a 37°C según el tamaño del frasco (5 mL para frascos de 25 cm² y entre 8 y 10 mL para frascos de 75 cm²).
3. Incubar a 37°C con 5% de CO₂.
4. Reemplazar el medio de cultivo cada 48 horas.

- **Subcultivo celular**

1. Revisar las células al microscopio para corroborar una confluencia del 90-95%.
2. Retirar el medio de cultivo por aspiración.
3. Lavar la monocapa con PBS 1X (3 mL para frascos de 25 cm² y 5 mL para frascos de 75 cm²) y retirar por aspiración.
4. Adicionar tripsina-EDTA al 0.05% para cubrir la monocapa (2 mL para frascos de 25 cm² y 3 mL para frascos de 75 cm²).
5. Incubar a 37°C por 5 a 10 minutos. Verificar el desprendimiento celular.
6. Inactivar la tripsina añadiendo un volumen igual de medio de cultivo con suero (proporción 1:1), agitando suavemente.
7. Transferir la suspensión celular a un tubo cónico de 15 mL.
8. Centrifugar para formar el pellet celular a 1500 rpm por 5 minutos.
9. Remover el sobrenadante con una pipeta estéril, evitando tocar el pellet celular.
10. Resuspender el pellet en el 1 mL de medio nuevo.
11. Sembrar en frascos nuevos a una densidad de 1:3 según la confluencia, utilizando medio nuevo suplementado.

- **Congelación celular**

1. Partir de un frasco de 75 cm² con 90% de confluencia.
2. Tripsinizar, inactivar y centrifugar según el protocolo de subcultivo.
3. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón celular en Suero Fetal Bovino (SFB) calculando 900 µL por cada criovial a preparar. La concentración final debe ser de 1 a 2 millones de células por mL.
4. Depositar en cada criovial 900 µL de la suspensión celular en SFB y 100 µL de DMSO (concentración final del 10%).
5. Agitar suavemente para homogeneizar, sellar con Parafilm y rotular.
6. Transferir los viales a Mr. Frosty y almacenar en ultracongelador (-80°C) durante 24 horas.
7. Transferir posteriormente a un contenedor de nitrógeno líquido.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- **PBS 10 X**

Reactivos	Cantidad
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	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**

Reactivos	Cantidad
Tris base	15.15 g
Glicina	94 g
SDS	5 g

Aforar a 1 L con agua MiliQ.

- **Buffer de lisis PKR 1X**

Reactivos	Cantidad
Buffer de lisis PKR 5X	200 µL
DTT 0.1 M	2 µL
PMSF 0.0871 g/mL	2 µL
Inhibidor de proteasas "Complete"	40 µL
Agua miliQ	756 µL

- **Buffer de carga 4X**

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl pH 6.8 0.5 M	1 mL
Glicerol	800 µL
SDS 10%	1.6 mL
Azul de bromofenol 1%	400 µL
Beta Mercaptoetanol	400 µL
Agua miliQ	3.3 mL

- **Buffer de corrida 4X**

Reactivos	Cantidad
Tris base	15.14 g
Glicina	94 g
SDS	5 g

Aforar a 1 L con agua miliQ

- **Buffer de corrida 1X**

Reactivos	Cantidad
Buffer de corrida 5X	200 mL
Agua miliQ	800 mL

- **Buffer de transferencia 10X**

Reactivos	Cantidad
Tris base	30.28 g
Glicina	14.41 g

Aforar a 0.5 L con agua miliQ

- **Buffer de transferencia 1X**

Reactivos	Cantidad
Buffer de transferencia 10X	100 mL
Metanol	200 mL
Agua miliQ	700 mL

- **TBS 10X**

Reactivos	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**

Reactivos	Cantidad
TBS 10X	100 mL
Tween 20	1 mL
Agua miliQ	900 mL

- **Rojo Ponceau 0.1%**

Reactivos	Cantidad
Ponceau S.	0.2 g
Ácido acético	10 mL

GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS

- **Gel separador al 12%**

Reactivos	Cantidad
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	4 mL
Tris-HCl pH 8.8 1.5 M	3.3 mL
SDS 10%	100 μ L
Agua miliQ	2.5 mL
Persulfato de amonio 70%	100 μ L
TEMED	10 μ L

- **Gel concentrador al 5%**

Reactivos	Cantidad
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	312 μ L
Tris-HCl pH 6.8 0.5 M	850 μ L
SDS 10%	25 μ L
Agua miliQ	1.825 mL
Persulfato de amonio 70%	25 μ L
TEMED	15 μ L

RT-qPCR

- **Primers utilizados**

Gen blanco	Secuencia (5'-3')	Concentración
<i>NS5A</i>	Forward: GGA ACG GGG ACA CTT ACA AA	10 μ M
	Reverse: TGC CTC TCT TCA TCC TTT GG	10 μ M
<i>SOD1</i>	Forward: AGG ACG TCA TCA ATT TCG AG	5 μ M
	Reverse: TGC CTC TCT TCA TCC TTT GG	5 μ M
<i>SOD2</i>	Forward: GGA ACG GGG ACA CTT ACA AA	5 μ M
	Reverse: CAC CCT CGT GCG AAT GAT GG	5 μ M
<i>CHOP</i>	Forward: CTC CTG GAA ATG AAG AGG AAG AA	10 μ M
	Reverse: CTT GTG ACC TCT GCT GGT T	10 μ M
<i>NRF2</i>	Forward: GTT GCC CAC ATT CCC AAA TC	10 μ M
	Reverse: CGT AGC CGA AGA AAC CTC AT	10 μ M
<i>ACTB</i>	Forward: AGG ACG TCA TCA ATT TCG AG	5 μ M
	Reverse: CAC CCT CGT GCG AAT GAT GG	5 μ M