



Caracterització de la infecció pel virus de l'hepatitis C en el marc del trasplantament hepàtic: estudi de l'expressió dels receptors d'entrada i dels antigens virals

Laura Mensa Garrigosa

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

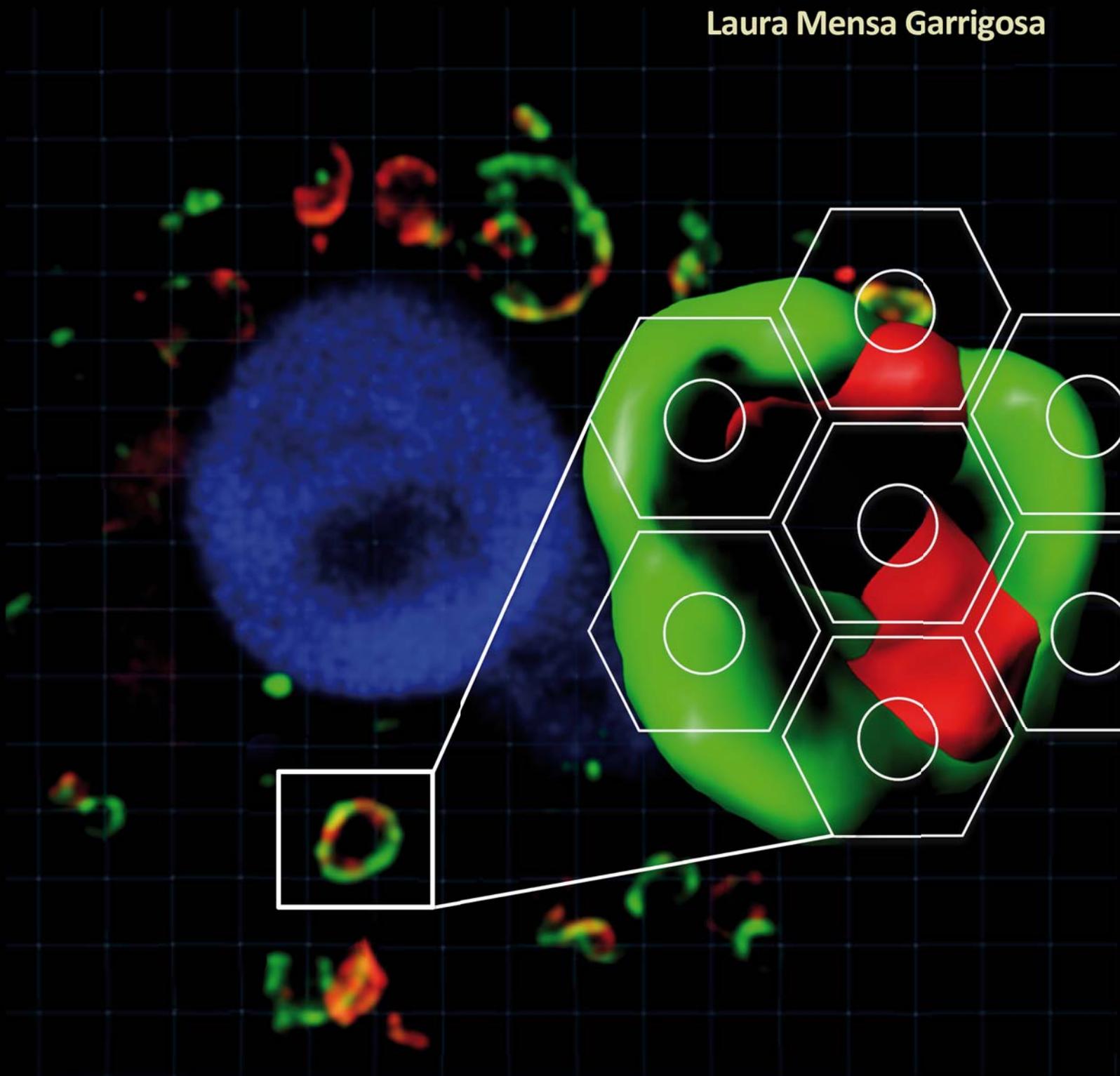
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

JUNY 2014

TESI DOCTORAL

CARACTERITZACIÓ DE LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE L'HEPATITIS C EN EL MARC DEL TRASPLANTAMENT HEPÀTIC: ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS D'ENTRADA I DELS ANTÍGENS VIRALS

Laura Mensa Garrigosa



UB

UNIVERSITAT DE
BARCELONA

HOSPITAL CLÍNIC
IDIBAPS



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Medicina

Tesi presentada per ***LAURA MENSA GARRIGOSA*** per a
optar al títol de Doctora en Biotecnologia

Realitzada al Laboratori d'Hepatitis Víriques, Servei d'Hepatology,
Hospital Clínic de Barcelona, IDIBAPS,

sota la codirecció de

Dra. Sofía Pérez del Pulgar Gallart i Dra. Rosa Miquel Morera.

Dra. Sofía Pérez del Pulgar Gallart

Dra. Rosa Miquel Morera

Barcelona, 2014

Informe dels Directors de Tesi

Sofía Pérez del Pulgar Gallart, Investigadora Sènior del Laboratori d'Hepatitis Víriques de l'Hospital Clínic de Barcelona i Doctora en ciències químiques per la Universitat de Barcelona; i **Rosa Miquel Morera**, Metge Consultor del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic i Doctora en Medicina per la Universitat de Barcelona,

CERTIFIQUEN

Que la tesi doctoral titulada **CARACTERITZACIÓ DE LA INFECCIÓ PEL VIRUS DE L'HEPATITIS C EN EL MARC DEL TRASPLANTAMENT HEPÀTIC: ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS D'ENTRADA I DELS ANTÍGENS VIRALS**, presentada per Laura Mensa Garrigosa per a optar al grau de Doctora en Biotecnologia ha estat realitzada sota la nostra direcció i compleix tots els requisits necessaris per ser defensada davant del Tribunal d'Avaluació corresponent.

Dra. Sofía Pérez del Pulgar Gallart

Dra. Rosa Miquel Morera

Directors de la Tesi
Barcelona, 2014

*Amb la valentia es comença.
Amb la perseverància s'aconsegueix.*

*Als meus pares, que m'han donat la vida.
Al Gerard, amb qui la comparteixo.
A l'Arlet, a qui li vull dedicar.*

Agraïments

A la **Dra. Sofía Pérez del Pulgar**, a la **Dra. Rosa Miquel** i al **Dr. Xavier Forns**, per a la direcció i supervisió d'aquesta tesi. Per a la vostra experiència i per brindar-me la oportunitat de formar part del laboratori d'hepatitis víriques.

Als doctors **Sánchez-Tapias** i **Miquel Navasa**, per a la seva rigurositat i esperit crític.

Al **Dr. Federico Rojo**, per com de fàcil, ràpid i fluïd és treballar al seu costat. Moltes gràcies per ajudar-me a veure-hi clar.

A tu, **Cupi**. Pel teu constant bon humor i alegria. Per la teva enorme simpatia i perquè sempre tens una paraula amable.

A la **Marta Montero**, capaç de fer de cada dia un somnriure. Visc a Catalunya, Visca Catalunya!

Als companys del lab: **Patri, Kuba, Mairene, Noelia, Sergi, Giorgos** i **Carrión**, pels bons moments compartits durant aquests anys. Però amb especial afecte a tu, **San**, pels inicis i les llargues tardes d'intensa i apassionant xerrera. Pel teu recolzament i savis consells tant en el terreny personal com en el professional. Vaig aprendre molt de tu i amb tu.

Al **Dr. Crespo (Gonxi)**, per il·lustrar-me en l'art de les "caídas de ojos". Per la teva eficiència i rapidesa en els enviaments de bases d'SPSS. Per les moltes hores compartides buscant blocs i ordenant biòpsies.

A les doctores **Lens, Mariño** i **Gambato**: a tu, **Sasi**, per la teva bondat i dolçura, per com de fàcil i agradable és poder treballar al teu costat. A la **Zoui**, inesgotable vitalitat i alegria en estat pur. Pels vells temps, per escoltar-me i ajudar-me quan ho vaig necessitar. Per les millors rialles compartides. A tu, **Marti**, per la teva sensibilitat i caràcter, per introduir-me en el món de la bellesa i per les divertides sortides pel barri de l'eixample en busca de pis. Ens hem conegut tard, però afortunadament hi ha hagut temps suficient per forjar una bonica amistat que espero perduri per sempre. He après moltes coses al teu costat. I amb tu he passat els millors moments al laboratori d'hepatitis víriques. Ets una lluitadora i arribaràs lluny. Spero col cuore che tu possa realizzare tutti tuoi sogni e illusioni. Grazie di tutto. Un bacio e un abbraccio forte per voi, amica mia. A totes vosaltres, que ha estat un magnífic plaer conèixer-vos.

Al **Carlos Fernández Carrillo** (alias **Charly, Carlos Jesús, Christopher** o **SCARB1**). De procedència manchega o raticuliniana, millor no preguntar. A tu, amic meu, perquè sense tu no hauria arribat al final. Gràcies pel teu recolzament, per la teva disposició immediata quan he necessitat ajuda de qualsevol tipus, per trobar una paraula d'ànim en el moment adequat i per tenir sempre a punt alguna anècdota que m'ha ajudat a desconnectar o a relativitzar les coses. Moltes gràcies per la teva bondat, sinceritat i transparència. Per la teva santa paciència. Pels teus

consells científics. Per ensenyar-me a ser cada dia una mica millor (el que inclou haver-me ensenyat a reciclar ;-). Ets una de les persones més nobles i intel·ligents que conec. Te echaré mucho de menos, compañero!

A tu, **Quim Ruiz**, per donar-me la oportunitat fa uns anys d'entrar al món del laboratori. Per escoltar-me i compartir amb mi noves il·lusions i nous projectes. Tu m'has ensenyat a pensar, a qüestionar-me les coses i has aconseguit treure la meua part més optimista quan semblava que tot sortia al revés. Gràcies per la teua emoció científica, perseverància i generositat. Per fer-me disfrutar de la ciència. Per fer-me costat. Però per sobre de tot, gràcies per apostar i creure tant en mi.

També agrair a totes aquelles persones que, tot i compartir moments efímers, han deixat un senyal en mi i/o han col·laborat de manera directa o indirecta en el desenvolupament d'aquesta tesi: **Ester García i Montse Monclús** (sou genials noies, uns solets!), **Cristina Millán, Susana García, Javi Gallego** (Visca el Vino!), **Laura Coch, Ingrid Rubio, Adriana Lázaro** (reina de les immunos), **Toni Martínez, Laura Gelabert, Mònica Marín, Marta Diví, Isa Sánchez, Maria Londoño, Javi Pérez, Loreto Boix, Juanma López, Salvador Martínez, Agustín Rodríguez, Josep Costa, Gemma Pérez, Gabi Ojeda, Martín Bonacci**.

I want to thank all of the Barti lab! Firstly, Prof. **Ralf Bartenschlager**, for giving me the opportunity to work in his lab. I have no words that can express how grateful I am for all the time that you took to help me and for your confidence in me. I would like to give special thanks to **Vane** and **David**, who made me feel at home and with whom I spent the best moments in Heidelberg with. I would like to thank **Laurent** (alias **Lolo, François** or **Jerome**) and **Karine**, for letting me try the best Canadian food I have ever had and for taking such good care of me. To you, **Ji Young (Jiji)**, I would like to say thank you for teaching me everything I needed to know. To you and our dreams! Thanks as well to you, **Steffi**, you are an angel. And to all of you: **Margarita, Alessia, Anil, Mirko, Daniel, Marion and the rest of the crew**, thank you for your smiles, your help and your friendship. My time in Heidelberg was wonderful and an important experience in my life. I am twice the person I was before I came here and I owe all of you. I miss you so much!

Agrair també a les diverses persones que he conegut durant els meus viatges, que han compartit amb mi la seva visió del món i, d'aquesta manera, han enriquit la meua.

A les nenes d'IPSI: **Marta, Anna Botta, Sara, Laia, Aina, Cristina i Anna Borrell**. Gràcies per haver-me fet riure en moments crítics i per haver-me fet costat, en certa manera, durant les meves crisis existencials. Per la nostra amistat. Pels moments viscuts i els que ens queda per viure.

A la gent del poble d'Ordal. Per tots aquells que esteu i pels que sembla que no esteu però quan fa falta apareixeu. En especial a tu, **Oriol**, per la nostra amistat i per la teua lluita i superació constant; a tu **Vicenç**, per la teua voluntat i valentia. Perquè no deixis de fer Km i arribis molt lluny; i a tu, mossèn **Pep Bertran**, que les teves paraules no només em van unir per sempre sinó que em van empènyer a

redactar aquest treball amb més il·lusió i entusiasme. Moltes gràcies a tots! Ordalencament, si senyor!

A l'**Antònia Casas** i a la **Montse Zapater**. Perquè sou dues dones increïbles, tot un referent per mi. Lluitadores, fortes, alegres, poderoses, incansables. Gràcies per la vostra humilitat i senzillesa. Però per sobre de tot, gràcies per ensenyar-me que un somnriure no significa l'absència d'un problema, sinó l'habilitat de ser feliç per damunt d'ell.

Al **Joan** i a la **Yolanda**: Pel vostre suport, amistat i enorme bon cor. Perquè sou genials i encara no ho sabeu. Perquè ha quedat demostrat que ni el temps ni la distància ens podran separar. Amb vosaltres he compartit les millors estrelles i m'he sentit molt especial. Gràcies companys! Espero que per molt de temps més ens poguem trobar a l'il·ly.

Al **Ferran Alemany**, per tants moments i pels rescats a temps. Perquè ja fa molts anys que ens coneixem i has estat aquí, allà, lluny o a prop, però sempre escoltant-me, animant-me i fent-me sentir important. Perquè tot i les adversitats que t'ha tocat viure els teus llavis mai han deixat de dibuixar un somnriure. Gràcies per deixar-me compartir amb tu tan bonica singladura. Ara toca continuar avançant, així que ja pots hissar veles que intueixo vents que bufen a favor.

A la **Mireia Badia**, per la teva fortalesa i energia. Perquè entre les dues hem entès que hem de desfer-nos de la vida que tenim planejada i acceptar i donar pas a la vida que ens espera. Gràcies pel teu suport i eterna confiança. No deixis d'aixecarte pensant que depèn de tu fer que cada dia sigui un bon dia.

Als amics de la facultat: **Laura i Ester; Sandra i Jonatan**. Lluny però a la vegada tan a prop. Heu marcat molt positivament la meva vida i m'heu ensenyat coses d'un valor incalculable. Amb vosaltres he fet els millors viatges, he compartit meravelloses experiències i les més sinceres rialles. Podria omplir un llibre sencer amb tant grans moments viscuts, amb les paraules d'esperança rebudes i les lliçons apreses... però ho deixo per una altra ocasió. Ara i aquí dir-vos que són aquests records els que us fan ser uns amics espectaculars i, per sobre de tot, molt especials. És per tanta felicitat donada que tant us estimo i us portaré per sempre més dins del meu cor. Milers de gràcies per ser-hi!

A la meva família postissa, als **Vendrell-Casas**. A tots, tiets i cosins, que m'heu acollit tan gratament i, segurament sense saber-ho, també heu fet això possible. Al tiet **Ricard**, amb molt d'afecte.

A la família **Mensa-Garrigosa**: A l'avi **Federic**, a qui amb prou feines vaig conèixer. A l'àvia **Agustina** i a l'àvia **Enriqueta**, que han cuidat sempre de tots nosaltres sovint oblidant-se d'elles mateixes. Gràcies per estimar-me tant i ser capaces de fer, amb quatre ingredients, una cuina d'estrella michelín. A l'avi **Joan**, el millor avi del món. Pels teus jocs de màgia i per com de màgic has estat per mi. Perquè al teu costat no només he assaborit molt bons vinets sinó que he après de les millors lliçons de vida. No oblidaré mai les passejades pel gòtic, ni les històries contades. Pels caramels de menta. Per les firetes i ulls de vidre. Gràcies avi pel teu temps, per

tants moments i per fer d'aquesta família una gran família (en tots els sentits). A tots vosaltres: **Ninin, Tena, Marta i Júlia; Joanet, Neus i Joan Àlex; Cuqui i David; Àngels, Máximo, Adrià i Martina; Quimi, Cèlia, Genís i Mireia;** Sou collonuts! I al vostre costat he crescut i he passat molts dels millors moments de la meva vida.

Al **Joan Sanglas**, per la teva valentia i perseverància. Pel pit i collons mostrats durant la teva llarga lluita contra el càncer. Perquè mentre compartim els millors ibèrics del Xalana m'ensenyaves que no hi ha distància que no es pugui recórrer ni meta que no es pugui assolir. Perquè és possible fer pràcticament qualsevol cosa si trobem dins nostre els recursos per creure que podem. A tu, camarada, en pau descansis. I a la **Carne Crespi**, que el seu amor, fortalesa i paciència infinita han contribuït a què els teus èxits esdevinguessin realitat.

A la **Rosa Dedieu**, per la teva predisposició, bondat, generositat i solidaritat. Pel teu suport en els moments més negres i perquè sempre dones sense esperar rebre. Perquè m'has sabut dir en el moment precís, les paraules adequades. Per escoltar-me i abraçar-me quan ho he necessitat. Perquè conèixer-te m'ha permès entendre millor el que de veritat és l'amistat.

Als sogres, **Joaquim i Elisabet**, per alimentar-me tant bé i estimar-me com una més. Al **Quim** i a la **Mònica**, per fer-me aprenent de "caçadora de bolets i espàrrecs". No sabeu com de bé m'ha anat desconnectar rastrejant la muntanya i olorant terra mullada. A les minis, **Llesta i Tremenda**, pels millors despertars.

Al **Xavier Sanjuan**. Conèixer-te ha donat sentit a les meves immunos i a la feina de tots aquests anys. Gràcies per contagiar-me tanta il·lusió i fer-me disfrutar del món de la microscòpia. Endinsar-m'hi amb tu ha esdevingut fascinant. Gràcies per tantes idees i alternatives i per aconseguir treure al màxim el senyal "paràsit". Perque sempre *ipso-facto* ho has resolt tot, amb la màxima eficiència i de la manera més altruista. Per la teva predisposició, amabilitat i pel teu bon cor. The best teacher ever (unes puntetes, per favor!). He après molt de tu i amb tu. Perquè per molts anys floreixi la *convallaria majalis* i volin les *lycaena virgaureae*. La teva amistat és sense dubte el millor regal que m'enduc d'aquesta etapa (+1).

A la **Laura Sanglas**, la meva amiga de l'ànima. Gràcies per estar al meu costat SEMPRE que et necessito. Per adoptar-me i per estimar-me. Per compartir amb mi el que ets i el que tens. Per tants moments bons i pels no tan bons, que ens han unit amb més força i ens han fet créixer juntes. Diuen que qui té un amic, té un tresor, oi? A mi, amb tu, m'ha tocat la loteria! Gràcies per existir, Laureta. Gràcies per tot.

A l'**Arlet**, que tot i que encara no et conec estic segura que ompliràs d'il·lusió i felicitat les nostres vides.

A tu, **Gerard**, et dedico aquest paràgraf tot i que m'agradaria dedicar-te un llibre sencer. És a tu a qui dec l'agraïment més especial d'aquesta tesi, perquè és gràcies a tu que estic avui aquí. Gràcies per ser la meva il·lusió i per demostrar-me que sempre puc comptar amb tu passi el que passi. Pel que has estat i pel que ets. Per

haver-me acompanyat, respectat i per haver animat constantment el meu esforç personal. Per la teva infinita paciència i amor incondicional. Per tu.

Als meus pares, **Josep** i **Rosa**, i al meu gos, l'**Akane** (alias **Caneta**). A la **Caneta**, per tanta companyia i per les millors passejades en silenci. Perquè mútuament ens hem salvat la vida. A tu, mare, que estàs sempre en tot i per tot. Per la teva incondicional entrega a la família. Per creure en mi i animar-me sempre. Perquè tot i les nostres diferències, tal i com diu la dita, de mare només n'hi ha una. I tu ets, sense dubte, la millor que em podia tocar. A tu pare, pel millor exemple de tenacitat, perseverància i professionalitat. Per la teva inesgotable entrega i dedicació a la feina. Per la teva humilitat, senzillesa i sentit de l'humor. Pels teus consells en el terreny personal. Pel teu temps i paciència en la correcció d'aquesta tesi. Perquè de tu he après que la major glòria no és mai caure sinó aixecar-se sempre. És per això, pare i mare, mare i pare, que no em queda un altra que atorgar-vos un *cum laude*: pel que heu fet i feu, pel que heu estat i sou i pel que m'heu donat i em doneu. Perquè tot el que tinc i sóc us ho dec a vosaltres. Us admiro! Us estimo!

A tota la gent que pateix una malaltia, però especialment a tots els pacients amb hepatitis C que han consentit l'ús de les seves mostres per a finalitats científiques.

"Y antes de que amanezca cambiará al este -dijo Legolas-. Pero descansad, si tenéis que hacerlo. Más no abandonéis toda esperanza. Del día de mañana nada sabemos aún. La solución se encuentra a menudo en la salida del sol". Las dos Torres. El Señor del Anells.

Abreviatures

3D	Tres dimensions
aa	Aminoàcids
AAD	Agents antivirals d'acció directa
ADH	Agents dirigits contra l'hoste
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADNc	ADN còpia
ADRP	Adipofil·lina
Alb-uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator transgene controlled by an albumin promoter</i> (transgen activador del plasminògen tipus uroquinasa controlat pel promotor d'albumina)
ALT	Alanina aminotransferasa
ApoA, B, C i E	Apolipoproteïnes A, B, C i E
ARFP	<i>Alternative reading frame protein</i> (proteïna de marc de lectura alternatiu)
ARN	Àcid ribonucleic
AST	Aspartat transaminasa
ATP	Adenosina 5'-trifosfat
bADN	<i>Branched DNA</i> (ADN ramificat)
BLT-4	<i>Blocker of Lipid Transfer 4</i> (blocador de transferència de lípids 4)
CAR	<i>Coxsackievirus and Adenovirus Receptor</i> (receptor del virus Coxsackie i d'Adenovirus)
CARDIF	<i>Caspase Recruitment Domain Adaptor Inducing IFN-β</i>
CD10	Cluster de diferenciació 10
CD81	Cluster de diferenciació 81
CDVP	Consumidors de drogues via parenteral
CLDN1	Claudina 1
CMV	Citomegalovirus
cPLA2	Fosfolipasa A2 dependent de calci
CV	Càrrega viral
CypA	<i>Cyclophilin A</i> (ciclofil·lina A)
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> (receptor de lectines tipus C d'expressió a cèl·lules dendrítiques)
DGAT1	<i>Diacylglycerol O-acyltransferase 1</i> (diglicèrid aciltransferasa 1)
E1 i E2	Glicoproteïnes 1 i 2 de l'embolcall del VHC
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor del factor de creixement epidèrmic)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i> (assaig d'immunoabsorció lligat a enzims)
EphA2	<i>Ephrin type-A receptor 2</i> (receptor 2 d'efrines tipus A)
EUA	Estats Units d'Amèrica
FA	Fosfatasa alcalina
FDA	<i>USA Food and Drug Administration</i> (administració d'aliments i fàrmacs dels EUA)
FFPE	<i>Formalin-Fixed, Paraffin Embedded</i> (fixades amb formalina i incloses en parafina)
FR	Forma replicativa

GAGs	Glicosaminoglicans
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (proteïna verda fluorescent)
GPP	Gradient de pressió portal
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (lipoproteïna d'alta densitat)
HHP	Hepatòcits humans primaris
HS	Heparansulfat
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i> (proteoglicà d'heparan sulfat)
HuH7	Línia cel·lular d'hepatocarcinoma humà
IFN	Interferó
IFN-PEG	Interferó alfa pegilat
IgG	Immunoglobulina G
IgM	Immunoglobulina M
IL28B	Interleuquina 28B
IP	Inhibidor de proteasa
IR	Intermediari replicatiu
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (lloc intern per a l'entrada del ribosoma)
ISDR	<i>Interferon sensitivity determining region</i> (regió de sensibilitat a l'interferó)
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecules</i> (molècules d'unió i adhesió)
JFH1	Hepatitis fulminant japonesa 1
L-SIGN	<i>Liver/lymph node-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing integrin</i> (receptor de lectines d'expressió a fetge i gangli limfàtic)
LCS I i II	<i>Low Complexity Sequence</i> (seqüència de baixa complexitat I i II)
LD	<i>Lipid droplet</i> (gota lipídica)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (lipoproteïna de baixa densitat)
LDLr	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i> (receptor de proteïnes de baixa densitat)
LEL	Llaç extracel·lular llarg
Luc	<i>Luciferase</i> (luciferasa)
MIR-122	Micro ARN-122
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i> (virus de la leucèmia murina)
MTP	<i>Microsomal Tryglyceride Transfer Protein</i> (proteïna microsomal de transferència de triglicèrids)
nt	Nucleòtids
NANB	Virus de la hepatitis no A no B
NC	<i>Non coding</i> (no codificant)
NPC1L1	Receptor Niemann-Pick C1-Like 1
NS	Proteïnes o gens no estructurals del VHC
NTPs	Nucleòtids trifosfat
OCN	Ocludina
OMS	Organització mundial de la salut
ORF	<i>Open reading frame</i> (marc de lectura obert)
p53	Proteïna 53
PBMC	Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacció en cadena de la polimerasa)
PI4IIIα	<i>Class III Type α Phosphatidylinositol 4-Kinase</i> (fosfatidilinositol 4-quinasa classe III tipus α)
PI4K	<i>Phosphatidylinositol 4-Kinase</i> (fosfatidilinositol 4-quinasa)

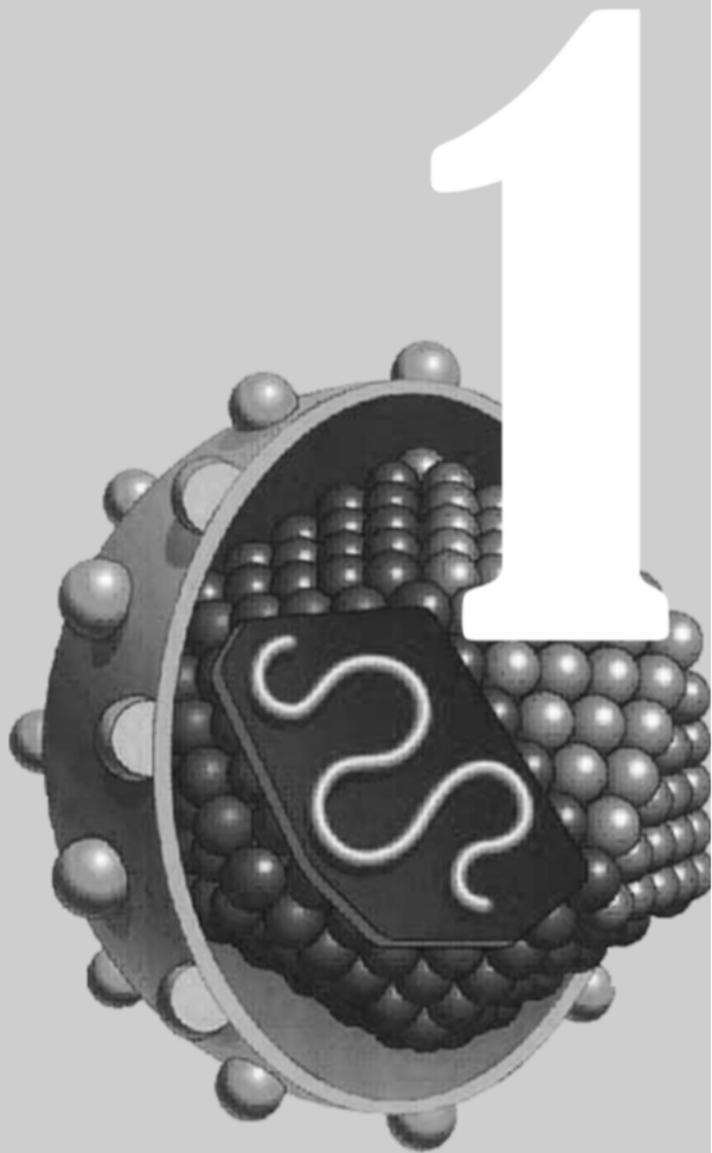
PI4P	<i>Phosphatidylinositol 4-Phosphate</i> (fosfatidilinositol 4-fosfat)
PKR	<i>Protein Kinase R</i> (proteïna quinasa R)
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription PCR</i> (retrotranscripció i reacció en cadena de la polimerasa quantitativa)
RBV	Ribavirina
RCA	Rebuig cel·lular agut
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> (polimerasa d'ARN dependent d'ARN)
RE	Reticle endoplasmàtic
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (polimorfismes de longitud de fragments de restricció)
RHV 1 i 2	Regió hipervariable 1 i 2 del genoma del VHC
RIG-I	<i>Retinoic-acid inducible gene-1</i> (gen-1 induïble per l'àcid retinoic)
RTK	<i>Tyrosine kinase receptor</i> (receptor tirosina quinasa)
RV	<i>Replication Vesicles</i> (vesícules de replicació)
RVS	Resposta virològica sostinguda <i>Severe combined immunodeficiency</i> (immunodeficiència combinada greu)
SCID	
sE2	Forma soluble de la proteïna E2
SR-B1	<i>Scavenger receptor class B type 1</i> o (receptor escombriaire classe B tipus 1)
TEMs	<i>Tetraspanin Enriched Microdomains</i> (microdominis enriquits d tetraspanines)
TH	Trasplantament hepàtic <i>Tail-interacting protein of 47 kDa</i> (proteïna de la cua d'interacció de 47 kDa)
TIP-47	
TJ	<i>Tight Junctions</i> (unions estretes)
TMA	<i>Transcription-Mediated Amplification</i> (amplificació mitjançant transcripció)
TRIF	<i>Toll/interleukin-1 Receptor Domain-containing Adaptor Inducing IFN-β</i> (molècula adaptadora dels receptors d'interleuquina I)
UI/mL	Unitats internacionals per mil·lilitre
VAP-A	<i>Vesicle-associated membrane protein, associated protein A</i> (proteïna de membrana associada a vesícules, associada a proteïna A)
VAP-B	<i>Vesicle-associated membrane protein, associated protein B</i> (proteïna de membrana associada a vesícules, associada a proteïna B)
VHA	Virus de l'hepatitis A
VHB	Virus de l'hepatitis B
VHC	Virus de l'hepatitis C
VHC_{CC}	Cultiu cel·lular del VHC
VHC_{PP}	Pseudopartícules del VHC
VHC_{PTC}	Sistema de partícules transcomplementades del VHC
VHD	Virus de l'hepatitis D
VIH	Virus de la immunodeficiència humana adquirida
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (lipoproteïna de molt baixa densitat)
ZO-1	<i>Zonula Occludens 1</i> (zónula ocludens 1)

Índex

1. Introducció	23
1.1 Antecedents i Epidemiologia del VHC	25
1.2 Diversitat genètica del VHC	29
1.3 Història natural del VHC	31
1.4 Mètodes de detecció i diagnòstic del VHC	33
1.4.1 Detecció d'anticossos anti-VHC	33
1.4.2 Detecció i quantificació de l'antigen core	35
1.4.3 Detecció i quantificació de l'ARN del VHC	35
1.4.3.1 Tests qualitius	35
1.4.3.2 Tests quantitius	36
1.4.4 Genotipatge del VHC	36
1.5 Hepatitis C i Trasplantament Hepàtic	38
1.6 Hepatitis C i Tractament	41
1.6.1 Agents Antivirals Directes (AAD)	42
1.6.1.1 Inhibidors de la proteasa NS3-4A (IP)	42
1.6.1.2 Inhibidors de la polimerasa NS5B (RdRp)	43
1.6.1.2.1 Anàlegs de nucleòsids/nucleòtids	43
1.6.1.2.2 Anàlegs no nuclòsids	43
1.6.1.3 Inhibidors de NS5A	44
1.6.1.4 Inhibidors del core	44
1.6.1.5 Inhibidors de p7	45
1.6.1.6 Inhibidors de NS4B	45
1.6.1.7 Inhibidors de l'IRES	46
1.6.1.8 Anticossos neutralitzants contra l'embolcall del VHC	46
1.6.2 Agents dirigits contra l'hoste (ADH)	47
1.6.2.1 Inhibidors de la ciclofil·lina A (CypA)	47
1.6.2.2 Antagonistes del micro ARN-122 (MIR-122)	47
1.6.2.3 Inhibidors de la quinasa fosfatidilinositol-4 (PI4K)	47
1.6.2.4 Inhibidors de la diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1) i la proteïna microsomal transportadora de triglicèrids (MTP)	48

1.6.2.5 Inhibidors dels receptors d'entrada del VHC	48
1.7 Biologia molecular del VHC	50
1.7.1 Proteïna Core	53
1.7.2 Proteïnes de l'embolcall	54
1.7.3 Proteïna p7	54
1.7.4 Proteïna NS2	55
1.7.5 Proteïna NS3-NS4A	55
1.7.6 Proteïna NS4B	56
1.7.7 Proteïna NS5A	56
1.7.8 Proteïna NS5B	57
1.8 Models d'estudi del VHC	58
1.8.1 Models <i>in vivo</i>	58
1.8.2 Models <i>in vitro</i>	59
1.8.2.1 El sistema de les pseudopartícules	60
1.8.2.2 El sistema del replicó	61
1.9 Cicle de vida del VHC	65
1.9.1 L'hepatòcit: mínima unitat funcional	65
1.9.2 L'entrada del VHC	67
1.9.2.1 Glicosaminoglicans (GAGs)	68
1.9.2.2 Receptors de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLr)	69
1.9.2.3 Scavenger Receptor Class B Type I (SR-B1)	69
1.9.2.4 Cluster de Diferenciació 81 (CD81)	70
1.9.2.5 Claudina-1 (CLDN1)	71
1.9.2.6 Ocludina (OCLN)	72
1.9.2.7 Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1)	72
1.9.2.8 Receptor del Factor de Creixement Epidèrmic (EGFR) i Receptor 2 d'Epinefrines tipus A (EphA2)	73
1.9.3 Replicació, Assemblatge i Alliberament	74
1.9.3.1 Les <i>lipid droplets</i> i la replicació del VHC	75
1.9.3.2 La via de secreció de partícules VLDL: assemblatge i alliberament del VHC	76
2. Hipòtesis i Objectius	79

3. Resum dels articles	85
3.1 Article 1: <i>Hepatitis C virus receptors claudina1 and occludin after liver transplantation and influence on early viral kinetics</i>	87
3.2 Article 2: <i>Imaging of hepatitis C virus infection in liver grafts after liver transplantation</i>	89
4. Discussió	93
5. Conclusions	107
6. Bibliografia	111
7. Annexos	137
7.1 Article 1: <i>Hepatitis C virus receptors claudina1 and occludin after liver transplantation and influence on early viral kinetics</i>	139
7.2 Article 2: <i>Imaging of hepatitis C virus infection in liver grafts after liver transplantation</i>	151



INTRODUCCIÓ

1.1 Antecedents i Epidemiologia del virus de l'hepatitis C (VHC)

L'hepatitis és una inflamació del fetge deguda a una o més de les següents causes: dany hepàtic produït per un tòxic (alcohol i fàrmacs), desordres autoimmunes i/o infeccions (virals o bacterianes). Donat els diferents agents virals causants d'hepatitis, aquestes es divideixen en dos grans grups: hepatitis virals no clàssiques (virus d'Epstein-Barr, virus de la febre groga, citomegalovirus) i hepatitis virals clàssiques, causades per virus hepatotrops.

Al final dels anys 40 es van distingir dos tipus d'hepatitis virals en funció del mecanisme de transmissió: entèrica o parenteral, les quals es van designar com "hepatitis A" i "hepatitis B" respectivament. Els agents etiològics causants d'aquestes malalties, però, no van ser identificats fins als anys 70, moment en el qual se'ls anomenà virus de la hepatitis A (VHA) i virus de l'hepatitis B (VHB). Poc després s'identificà l'antigen delta, una proteïna d'expressió nuclear localitzada als hepatòcits de pacients amb infecció crònica per VHB (1). Aquesta va resultar ser la proteïna de la nucleocàpside d'un nou virus que es denominà virus de l'hepatitis D (VHD), el qual, tot i ser capaç de replicar el seu genoma autònomament, requeria de l'antigen de superfície del VHB per a la formació de les partícules virals (d'aquí VHD, on D significa "defectiu").

El virus de l'hepatitis C (VHC) va ser identificat i caracteritzat a Chiron Corporation l'any 1989 per Choo i col·laboradors (2) després de múltiples investigacions per a la detecció del genoma del virus de l'hepatitis no-A no-B (NANB). Aquest fet va permetre el desenvolupament de les primeres tècniques de detecció d'anticossos anti-VHC (3), el principal agent causant de les hepatitis postransfusionals. La infecció pel VHC és la principal causa d'hepatitis crònica, cirrosi i carcinoma hepatocel·lular així com la indicació més freqüent de trasplantament hepàtic (TH) en els països desenvolupats. Actualment constitueix un problema sanitari a escala mundial amb una prevalença aproximada del 2,5%-3% de la població (4), l'equivalent a 130-170 milions d'infectats la majoria dels quals es troba a Àsia (92 milions) i Àfrica (32 milions)(5). A Europa hi ha 9 milions d'afectats (6) i als Estats Units d'Amèrica de 3,5 a 5 milions (7). Segons les xifres més recents de la Organització Mundial de la Salut (OMS), s'estima que anualment apareixen de 3 a 4

milions de noves infeccions i moren més de 350.000 persones per malalties hepàtiques relacionades amb el VHC. A l'actualitat es diagnostiquen anualment uns 350.000 nous casos d'hepatitis C al Japó i uns 150.000 als Estats Units d'Amèrica (EUA) i a Europa Occidental, el que suposa un gran impacte a nivell social i econòmic.

La infecció pel VHC té una distribució universal però la seva prevalença varia considerablement entre països en funció de la importància que posseeixen en cada lloc els diferents mecanismes de transmissió. Aquesta és màxima (>10%) en diversos països d'Àfrica i del Mediterrani Oriental, essent Egipte el lloc amb major prevalença de la infecció a nivell mundial (17,5%) (5). Als EUA s'estima en un rang d'entre l'1,3% i l'1,9% (7), a alguns països europeus com Suècia, Alemanya i Països Baixos és del 0,4% mentre que a alguns indrets del Mediterrani es xifra en un 2%-3% (superant el 5% en algunes comunitats d'Itàlia) (8) (**Figura 1**). Estudis epidemiològics realitzats a Espanya xifren entre 480.000 i 560.000 el nombre de persones anti-VHC positives, el que suposa una prevalença entre l'1% i el 2,6%. Dins d'Espanya, existeixen diferències geogràfiques amb una major afectació a les comunitats autònomes més urbanitzades (entre el 2,5 i el 2,6% a Madrid i Catalunya respectivament) i menor en les menys urbanitzades (1,6% a Astúries).

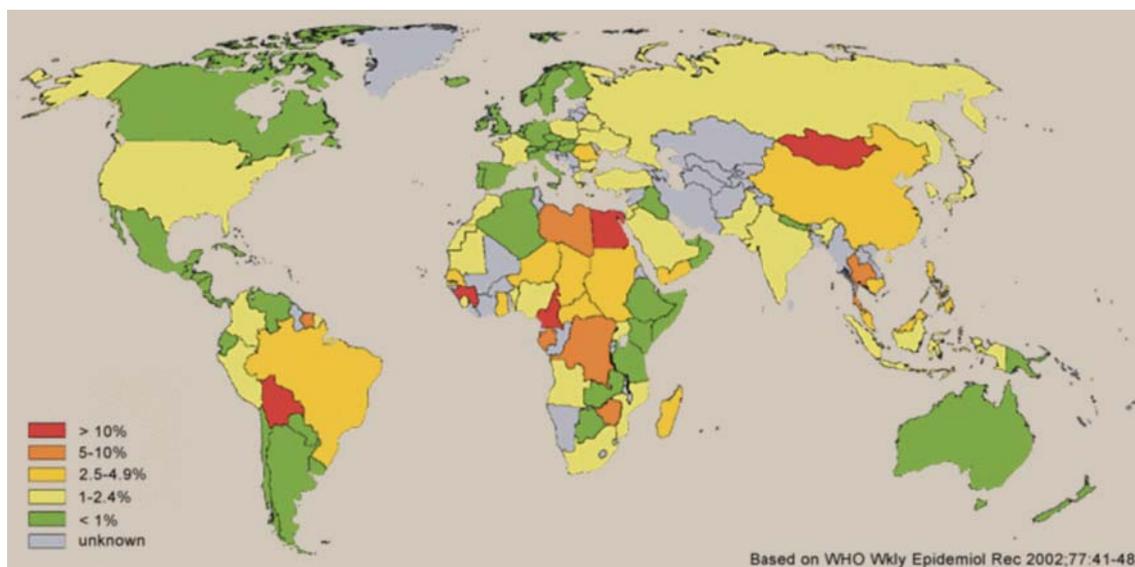


Figura 1. Prevalença mundial estimada de la infecció pel VHC segons l'OMS (Hepatitis C, 2002). Àfrica (5,3%); Amèrica (1,7%); Mediterrani Est (4,6%); Europa (1,03%); Sudest Àsia (2,15%), Pacífic Oest (3,9%); Total: 3,1% (Font: OMS, Weekly Epidemiological Records).

Cal destacar que els grups de risc com són els consumidors de drogues per via parenteral (CDVP), immigrants, persones sense llar i presos acostumen a estar insuficientment representats en els estudis de població general, motiu pel qual dites taxes són propenses a estar considerablement subestimades.

La distribució per edat també és heterogènia, mostrant una corba amb dos pics indicatius de patrons epidemiològics diferents: un corresponent a un grup d'edat d'entre 30-40 anys, la infecció dels quals és atribuïble al consum de drogues per via parenteral; i l'altre corresponent a edats majors de 60 anys, deguda a la recepció de transfusions de sang i productes hemoderivats administrats abans de l'any 1990 (moment en el qual es començaren a realitzar els primers tests pel cribratge de marcadors serològics del VHC i es reduí el risc d'infecció al 0.2% per unitat de sang transfosa).

Les diferències per sexe són més notables en edats compreses entre els 25 i 45 anys, on és més elevada la prevalença en homes probablement degut al fet que la toxicomania intravenosa és més freqüent en aquest grup d'individus.

El VHC es pot transmetre per diferents vies, essent la parenteral la més eficaç i l'ús de drogues per via intravenosa el principal mecanisme descrit. A Espanya, la prevalença de l'ús de drogues injectades entre pacients infectats amb el virus de la immunodeficiència humana (VIH) va disminuir del 97,3% al 1997 al 14,5% al 2006. Un descens paral·lel s'observà en la prevalença de la coinfecció amb el VHC, que passà del 73,8% al 19,8% en el mateix període de temps (9). Pacients sotmesos a hemodiàlisi presenten una elevada prevalença de la infecció, la qual és molt variable d'un país a un altre i està associat a la durada del tractament (10). La propagació de la infecció en aquests casos, així com en situacions que requereixen llargs períodes d'hospitalització, és deguda a la transmissió nosocomial (11), mitjançant l'ús d'equips o materials contaminats entre pacients i a la pràctica de procediments invasius.

Tot i el coneixement dels factors de risc per a la transmissió de l'hepatitis C, molts dels infectats no presenten una història que suggereixi una ruta d'adquisició parenteral. La principal hipòtesi que explica aquest fet és l'exposició parenteral inaparent (injeccions intramusculars no estèrils, tatuatges, *piercings*, acupuntura, afeitat en barberies, etc.) (12, 13). Pel que fa a la transmissió sexual, no existeixen evidències d'un risc més elevat en relacions monògames heterosexuales estables. És

en les pràctiques sexuals d'alt risc, en relacions homosexuals associades a certs hàbits (múltiples parelles sexuals, *fisting*, etc.), en cas de coinfecció amb el VIH o quan existeixen antecedents d'altres malalties de transmissió sexual, que el risc es veu notablement incrementat (14-17). No s'han descrit evidències de transmissió del virus a través del sexe oral excepte en casos de lesions mucoses.

La transmissió vertical o perinatal és la causa principal d'infecció en nens, amb una prevalença aproximada del 5% (18). Aquesta es veu incrementada si la mare està co-infectada amb el VIH i si la càrrega viral (CV) és elevada i està influenciada pel trencament prematur de membranes, el genotip del virus, la durada del part i el sexe del nadó (19). La lactància materna no ha estat implicada a llarg plaç en la transmissió del VHC (excepte en casos de lesions amb sangrat als mugrons) (20) i no s'han trobat diferències en la transmissió segons el tipus de part (vaginal o cesària).

1.2 Diversitat genètica del VHC

Fins a data d'avui s'han identificat 7 genotipus del virus mitjançant l'anàlisi filogenètic de diferents aïllats del VHC (**Figura 2**). Els diferents genotipus difereixen entre un 30%-35% en la seva seqüència nucleotídica i cada un d'aquests està dividit en diferents subtipus (a, b, c, etc), les seqüències dels quals divergeixen entre el 20%-25%. En un individu infectat s'estima que es produeixen, aproximadament, unes 10^{12} partícules virals per dia. L'elevada taxa de replicació, juntament amb el fet que la polimerasa viral no té activitat correctora d'errors (1 per cada 10^4 - 10^5 nucleòtids), comporta una gran heterogeneïtat genètica dins d'una mateixa població viral, el que es coneix amb el terme de quasiespècie. Per tant, en un mateix individu, el VHC circula com una població de genomes estretament relacionats amb una variació nucleotídica de l'ordre de l'1-2% (21, 22).

Els genotipus del VHC tenen una prevalença i distribució geogràfica molt diversa: el genotip 1 (1a i 1b) és el més comú als EUA i Europa, tot i que es troba arreu del món i és el causant del 60% dels casos d'hepatitis C. El segueix el genotip 2 (2a i 2b) i després el 3 (predominantment el 3a). A Egipte, Àfrica del Nord i l'Orient Mitjà el genotip 4 és el més prevalent mentre que el 5 i el 6 predominen a Sud Àfrica. El setè genotip, descrit recentment, s'ha trobat en pacients de la República Democràtica del Congo (23).

El genotip té importància clínica ja que determina la virulència i la resposta al tractament. Els pacients infectats pel genotip 2 del virus són els que tenen més probabilitats d'eliminar-lo després de la teràpia amb interferó (IFN), assolint taxes de resposta viral sostinguda (RVS) al voltant del 80%. Contràriament, els genotipus 1 i 4 són els que tenen pitjor resposta al tractament, essent els valors de RVS inferiors al 50% per als pacients amb genotip 1.

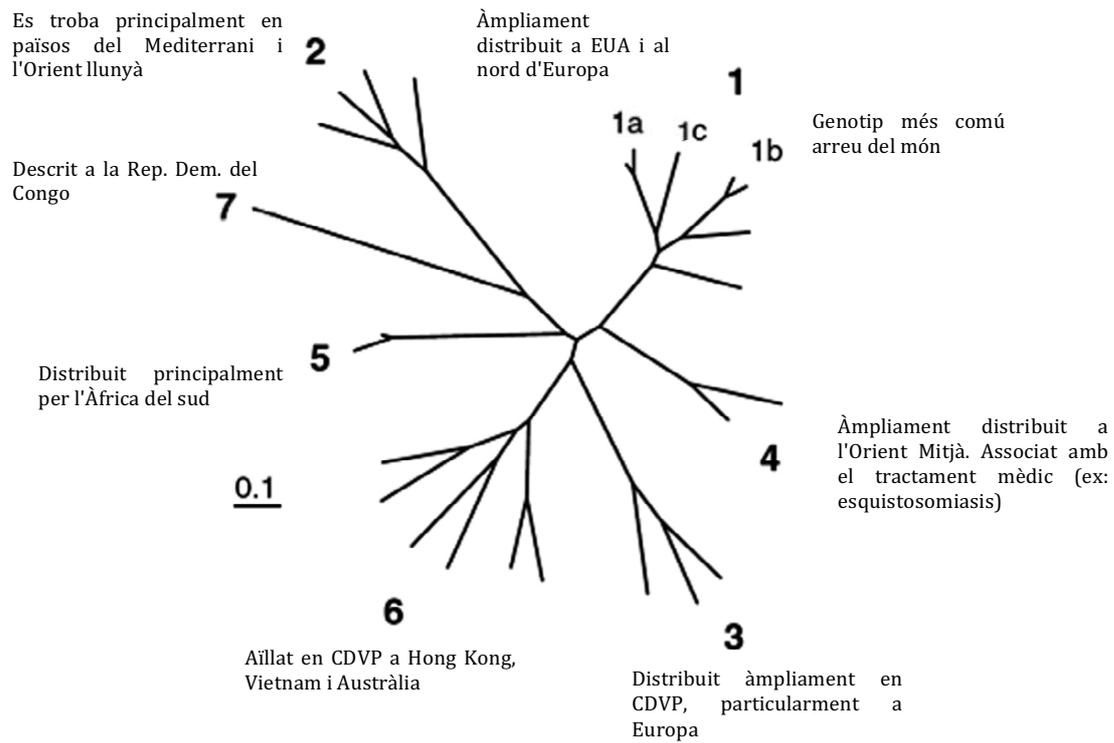


Figura 2: Distància genètica entre els diferents genotipus del VHC i principals associacions epidemiològiques. Imatge adaptada de Delaney *et al.* (24) i Simmonds *et al.* (25)

1.3 Història Natural del VHC

La història natural de la infecció és difícil d'establir atès que el contagi acostuma a passar inadvertit i és una malaltia, en general, asimptomàtica en els seus inicis (60-75% dels casos). Durant els primers mesos de la infecció (fase aguda), l'hepatitis C pot seguir dos cursos evolutius: a). En un 15%-25% d'individus la infecció es resol de forma espontània sense cap tipus de tractament; b). En un 75%-85% dels casos, tot i poder experimentar una normalització de les transaminases, la persistència de l'ARN-VHC més enllà dels sis mesos fa que es constitueixi la forma crònica de la malaltia (26, 27). El curs individual de la infecció és molt variable i està influenciat per molts factors. Recentment s'ha vist que variants del gen de la interleuquina 28B (IL28B) poden influenciar l'eliminació espontània del virus (28) i es coneix també que, la taxa d'infecció crònica pel VHC així com la velocitat de progressió de la malaltia depenen de l'edat de la persona en el moment de la infecció (>50 anys), el gènere (sexe masculí), la raça (africans vs caucàsics), la coinfecció amb altres virus (VIH/VHB), la resposta immunològica, la síndrome metabòlica, l'índex de massa corporal i altres factors com el tabaquisme o el consum d'alcohol (>30g/dia) (29, 30). El temps mitjà en el desenvolupament de la cirrosi es situa al voltant de 10-50 anys i durant aquestes dècades no acostumen a haver-hi símptomes tot i el dany hepatocel·lular i la reacció inflamatòria crònica del fetge. La persistència d'aquests estímuls, però, és responsable de la progressió de la fibrosi i la formació de nòduls de regeneració, elements que condueixen a l'aparició de la cirrosi. La progressió de la fibrosi és altament variable i, tot i que en la majoria de pacients succeeix lentament, aquesta s'accelera en estadis més avançats de fibrosi (31). El genotip 3 del VHC i determinats polimorfismes nucleotídics s'han associat significativament al risc i a la velocitat de progressió de la fibrosi (32).

Les dues grans conseqüències de la cirrosi són la insuficiència hepatocel·lular i la hipertensió portal, les quals acabaran generant processos de descompensació de la malaltia (ascitis, encefalopatia hepàtica, hemorràgia digestiva per varius esofàgiques, icterícia, síndrome hepatorenal), generalment anys després que aquesta s'hagi diagnosticat. La taxa de supervivència estimada quan la cirrosi està compensada és del 96%, 91% i 79% als 3, 5 i 10 anys respectivament i la probabilitat acumulada d'un episodi de descompensació és del 5% durant el

primer any i del 30% als 10 anys posteriors al seu diagnòstic (33). Un cop la descompensació és present, la probabilitat de supervivència es redueix al 50% als 5 anys (34). Actualment un 15% dels pacients cirròtics acaben desenvolupant un carcinoma hepatocel·lular, amb una taxa de desenvolupament anual estimada de l'1% al 4%. El trasplantament de fetge en pacients amb una cirrosi severament descompensada o carcinoma hepatocel·lular és l'única opció per a la seva supervivència (**Figura 3**).

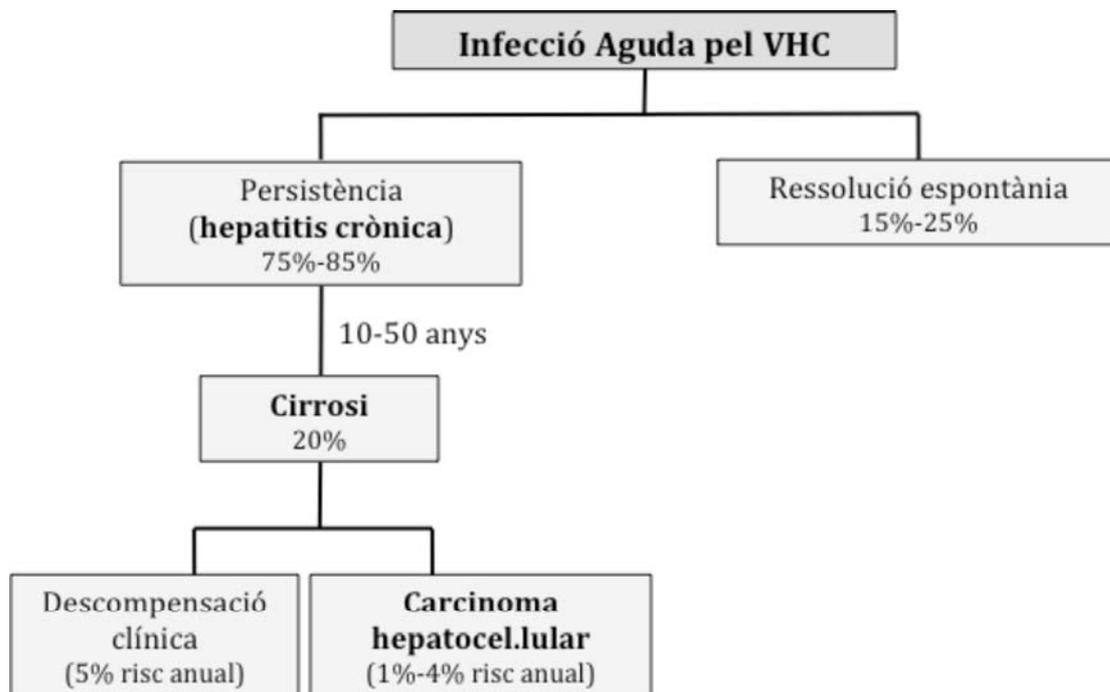


Figura 3: Història natural del VHC. Figura adaptada de Chen *et al.* (35)

1.4 Mètodes de detecció i diagnòstic del VHC

La malaltia hepàtica en molts casos és clínicament silenciosa fins que arriba a fases avançades del seu curs. És per això que es necessiten proves de laboratori per al seu reconeixement i per la caracterització del dany hepàtic existent. El diagnòstic d'hepatitis es basa en la determinació bioquímica de determinats marcadors de la funció del fetge: bilirrubina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartat aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA), temps de protrombina, proteïnes totals, albúmina, globulines, així com estudis de coagulació i hemograma. Per documentar l'exposició al virus i la seva presència existeixen diferents proves que permeten diagnosticar i monitoritzar l'evolució de la infecció: assaigs per al cribatge d'anticossos anti-VHC, proves per a la detecció de l'antigen core, tècniques per a la detecció i quantificació de l'ARN-VHC i tests de genotipatge del VHC. Algunes d'aquestes metodologies són fonamentals per valorar la resposta virològica al tractament i prendre decisions terapèutiques adequades (optimització de la durada del tractament i regles de parada) així com per ajustar les dosis de ribavirina (RBV) necessàries i oferir informació al pacient sobre el pronòstic de la teràpia (donat que el genotip i la concentració d'ARN-VHC són elements predictors de resposta) (36).

1.4.1 Detecció d'anticossos anti-VHC

Els anticossos anti-VHC apareixen aproximadament a les 2-8 setmanes després del contagi i persisteixen indefinidament en aquells pacients que desenvolupen la forma crònica de la malaltia (37) (**figura 4**). La presència d'anticossos contra el virus pot ser indicatiu d'una infecció passada o present, el que fa que es requereixin tècniques complementàries per confirmar l'existència del VHC.

La detecció i quantificació d'anticossos específics contra el VHC es basa en proves enzimàtiques: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Els tests ELISA de tercera generació usen antígens sintètics o recombinants que representen seqüències del virus (derivades de la proteïna core [c22-3], de la regió no estructural NS3 i NS4 [c33-c, c100-3, c200] i de la proteïna NS5) per capturar anticossos circulants (ex: RIBA™). La presència dels anticossos es revela

mitjançant anti-anticossos units a un enzim que catalitza la reacció d'un substrat que dona un compost de color. La densitat òptica de la reacció és proporcional a la quantitat d'anticossos presents a la mostra.

Els tests que hi ha disponibles basats en la detecció d'anticossos anti-VHC no permeten la distinció entre la forma aguda i crònica de la malaltia ja que els nivells d'immunoglobulina M (IgM) anti-VHC es troben en un 50-93% dels pacients amb hepatitis C aguda i en un 50-70% dels pacients amb infecció crònica (38). Un resultat positiu en les proves d'ELISA necessita ser confirmat mitjançant tècniques de reacció en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) pel VHC.

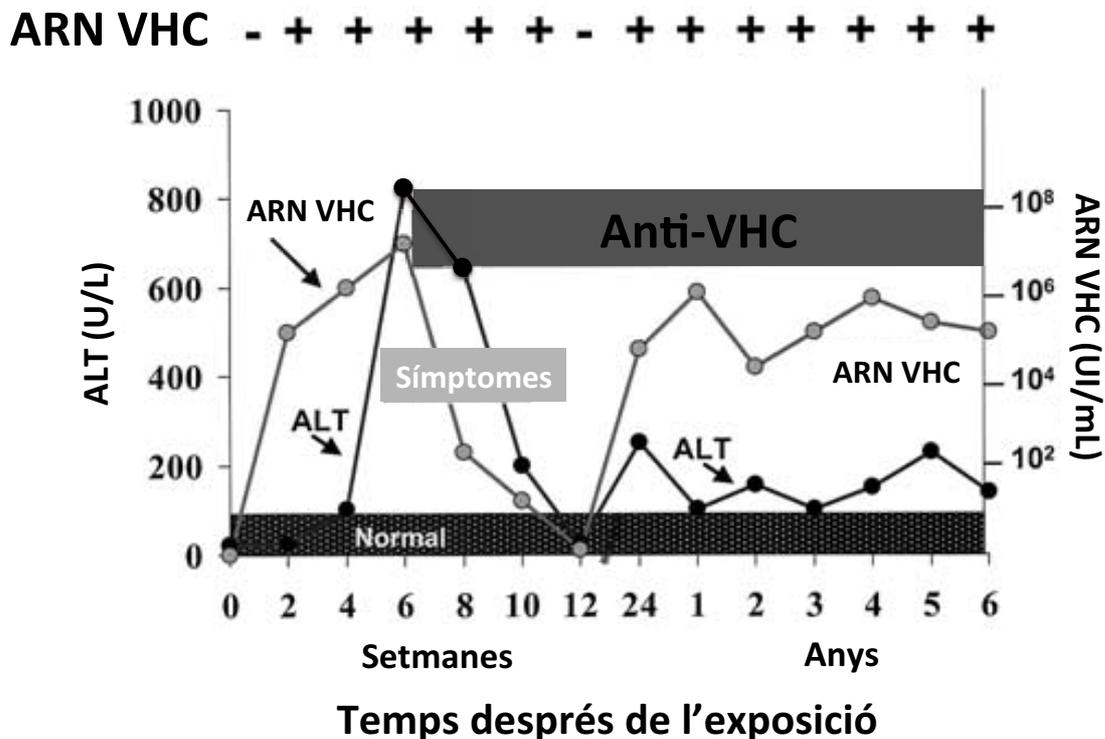


Figura 4: curs de la infecció aguda i crònica del VHC: l'evolució dels valors de CV i ALT al llarg del temps es mostren en cercles grisos i negres respectivament. Els resultats dels tests quantitatius de l'ARN-VHC es mostren en UI/mL, mentre que els resultats qualitius es representen en símbols que indiquen la presència (+) o absència (-) del virus en sang. Els nivells normals o indetectables d'aquestes variables es situen dins la franja puntejada. Valors elevats d'ALT s'observen aproximadament als 40-50 dies després de la infecció, amb pics que tendeixen a estar entre 400 i 1000 U/L. Els anticossos anti-VHC apareixen aproximadament a les 2-8 setmanes després de l'exposició inicial al virus. Hoofnagle *et al.* (26)

1.4.2 Detecció i quantificació de l'antigen core

Existeixen diferents estudis que demostren que hi ha una bona correlació entre els nivells d'ARN-VHC i l'antigen core (39), el que fa que la quantificació de core en sang perifèrica d'individus infectats sigui una tècnica alternativa a la PCR. La tècnica es duu a terme mitjançant un assaig immunològic econòmic que no requereix de personal especialitzat i que és menys susceptible a patir contaminacions creuades que les proves d'amplificació d'ARN (40). Tot i així, la detecció de core és menys sensible que la detecció d'ARN, situant-se al voltant de les 500-3000 UI/mL depenent del genotip del virus (41). S'ha descrit la utilitat d'aquest test per a la monitorització de la CV en pacients amb infecció crònica pel VHC i per a l'assaig de resposta virològica al tractament antiviral (41, 42).

1.4.3 Detecció i quantificació de l'ARN del VHC

La presència d'ARN en sang perifèrica és un marcador de replicació del virus. L'ARN pot ésser detectat d'1 a 3 setmanes després de la infecció, aproximadament un mes abans que apareguin els anticossos anti-VHC (el que fa que sigui un mètode excel·lent per al diagnòstic precoç de la malaltia). La presència d'ARN-VHC sis mesos després de la infecció inicial és indicatiu de cronicitat, i és a partir d'aquest moment en què els nivells d'ARN resten relativament estables en el temps. Aquesta prova pot ser emprada per a l'estudi del risc de transmissió vertical i per a diferenciar la superposició de patologies. També és molt útil en la monitorització de l'eficàcia dels tractaments. Es poden diferenciar dos tipus de proves: les que determinen la presència (test qualitatiu) i les que determinen la quantitat (test quantitatiu) d'ARN-VHC.

1.4.3.1 Tests qualitius

Es basen en l'amplificació de l'ARN-VHC ja sigui mitjançant PCR o amplificació mitjançant transcripció (*Transcription-Mediated Amplification*, TMA). Existeixen dos tests comercials disponibles: un basat en la tècnica de PCR (Cobas Amplicor HCV v2.0, de Roche Molecular Systems) amb un límit de detecció de 50 UI/mL i un

altre basat en TMA (Versant HCV RNA Qualitative Assay, de Bayer Corp.), amb una sensibilitat de 10 UI/mL. L'especificitat en els dos casos és del 98%-99% i el resultat és sempre qualitatiu (positiu/negatiu) (43) (**Figura 5**).

1.4.3.2 Tests quantitius

Les tècniques quantitatives determinen la CV mitjançant l'amplificació directa d'un fragment del genoma viral (generalment l'extrem 5') a temps real (tècnica anomenada *quantitative Reverse Transcription PCR*, qRT-PCR), o a partir de l'amplificació del senyal que es produeix en reconèixer la diana (tècnica anomenada *branched DNA*, bADN). La qRT-PCR consisteix en la retrotranscripció de l'ARN-VHC i l'amplificació de l'ADN còpia (ADNc) resultant. A cada cicle d'amplificació es mesura la fluorescència emesa pels amplicons generats. Aquesta tècnica té un ampli rang de detecció que va des de 10-15 UI/mL fins a 7-8 Log₁₀ UI/mL (**figura 5**). Existeixen diferents plataformes disponibles per a la quantificació de l'ARN, com per exemple les de Cobas Taqman (Roche Molecular System) i Abbott (Abbott Diagnostics). El bADN consisteix a intensificar, mitjançant molècules ramificades (*branched*), el senyal emès per les sondes d'hibridació utilitzades per a la detecció de la diana. La plataforma usada actualment al nostre centre és Versant ARN VHC (Siemens), i el rang dinàmic de detecció és de 615 a 7700000 UI/mL (**figura5**).

1.4.4 Genotipatge del VHC

La determinació del genotip és necessària abans d'iniciar la teràpia amb IFN i RBV, ja que d'aquest en depèn la dosi i la durada del tractament. La seqüenciació directa de determinades regions del genoma del VHC (E1E2 i NS5B) i posterior anàlisi filogenètic és la tècnica més exacta per a la determinació del genotip. A la pràctica clínica existeixen tres mètodes basats en l'anàlisi de seqüències de la regió 5' NC generades per PCR: un basat en la seqüenciació directa dels amplicons utilitzant, The Trugene 5'NC HCV Genotyping kit (Siemens Medical Solution Diagnostics), un altre basat en la hibridació dels amplicons mitjançant sondes específiques (INNO-LiPA HCV II, Innogenetics) i un tercer mètode basat en l'anàlisi de polimorfismes

de fragments de restricció (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLPs). Aquesta regió, tot i ser altament conservada, presenta alguns polimorfismes que permeten distingir seqüències de diferents genotip (i subtipus en alguns casos). La determinació del serotip també es pot realitzar mitjançant el serotipatge (detecció d'anticossos específics per a cada genotip), tot i que amb aquesta tècnica no és possible determinar els subtipus i es pot produir reactivitat creuada (40).

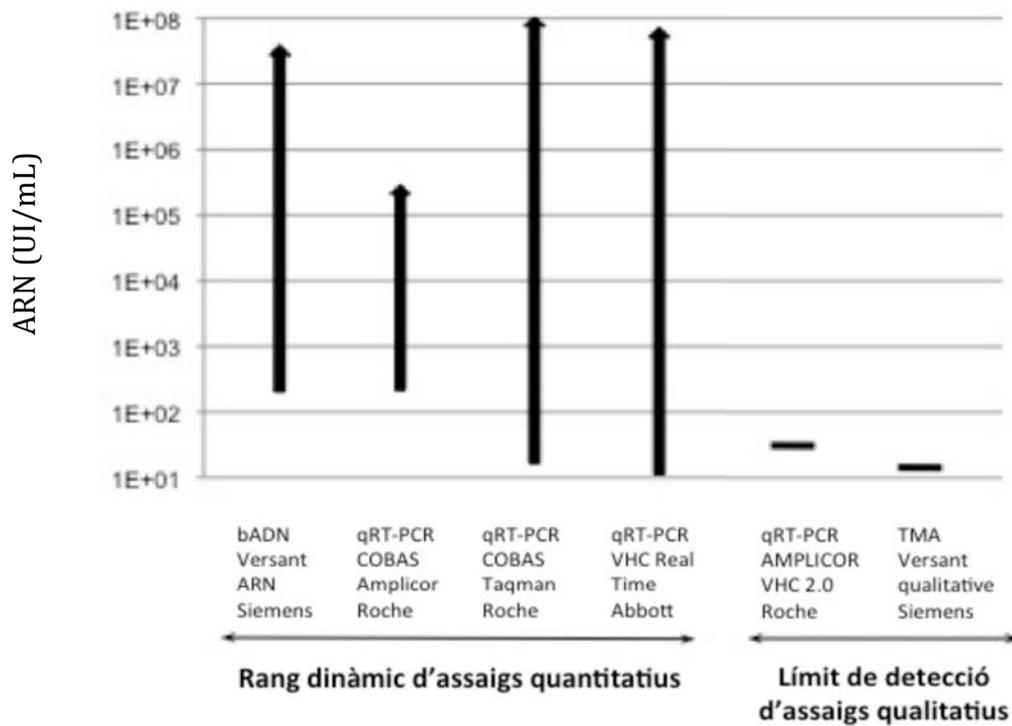


Figura 5: rang dinàmic i límit de detecció dels assaigs qualitius i quantitius de l'ARN-VHC.

1.5 Hepatitis C i Trasplantament Hepàtic

El TH es pot considerar un bon model per a l'estudi de la transmissió del VHC i dels seus mecanismes patogènics, doncs es coneix el moment exacte en què succeeix la infecció (el que permet fer estudis immunològics i de cinètica viral), la història natural del virus es veu accelerada i, en el context de la pràctica assistencial habitual, es poden obtenir de forma seqüencial diferents mostres de fetge i sèrum. Tot i així, també existeixen desavantatges associades a aquest model com ara: el dany d'isquèmia/reperfusió, el grau de desigualtat dels antígens leucocitaris humans, factors genètics associats al donant i els efectes de la immunosupressió (factor que pot dificultar-ne l'estudi donada la gran influència en la severitat i en la progressió de la malaltia) (44, 45).

Durant el TH el fetge del pacient, la font principal de virions, és extret i substituït per un nou òrgan que s'infectarà immediatament a partir de les partícules virals circulants o remanents en altres compartiments extrahepàtics (46). La fase anhepàtica es caracteritza per una disminució dràstica de la CV, associada per un costat al gran volum de sang que es perd durant l'acte quirúrgic i per altra banda, a l'entrada massiva del virus en el nou òrgan. La replicació del virus comença poques hores després del TH i els nivells d'ARN-VHC incrementen en qüestió d'hores o al cap de pocs dies, assolint xifres de CV similars a les del pre-TH (44) (Figura 6).

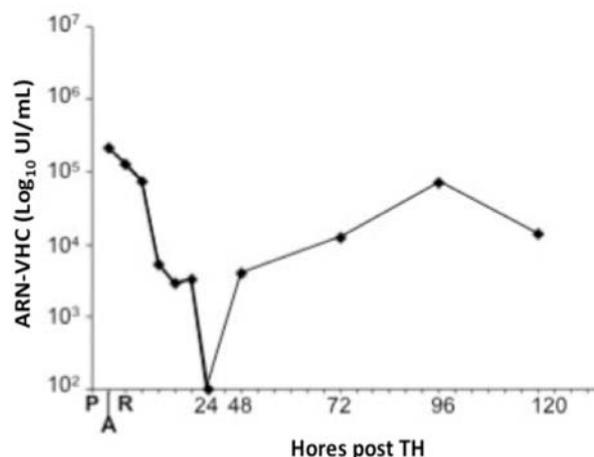


Figura 6: Cinètica del VHC. Durant la fase anhepàtica (A) es produeix un descens de la CV en sèrum el qual es veu accentuat després de la reperfusió (R) del fetge del donant, suggerint que els virus circulants infecten de manera ràpida el nou òrgan. Posteriorment, a les poques hores del trasplantament, s'observa un augment de la CV, el que indica que la replicació viral és efectiva de forma precoç. Durant la fase aguda de la infecció s'assoleixen els valors màxims de CV, els quals disminueixen i s'estabilitzen durant la fase crònica de la malaltia. Imatge adaptada de García-Retortillo *et al.* (47).

Aquest fet demostra l'elevada capacitat del virus per adaptar-se al nou medi, la qual és deguda principalment a la ràpida evolució genètica característica de molts virus ARN i a la naturalesa del VHC en forma de quasiespècie (factors també estretament associats amb la persistència viral) (48).

La forma aguda de l'hepatitis succeeix entre el mes 2 i 5 post-TH i es caracteritza per una hepatitis aguda. És en aquest moment en què s'assoleixen els nivells màxims de CV, aproximadament 1 ó 2-Log₁₀ superiors als valors del pre-TH (47, 49), possiblement perquè el nou òrgan és capaç de suportar millor la replicació viral (50). L'hepatitis crònica s'estableix als 6-12 mesos posteriors al TH i es caracteritza per una disminució de la CV i pel dany hepàtic fruit de la resposta immune de l'hoste. Una variant de la infecció pel VHC post-TH és la forma colestatàtica de l'hepatitis C, que succeeix en menys del 10% dels pacients i està freqüentment associada a CV elevades i a la immunosupressió. Aquesta té lloc generalment entre el primer i el sisè mes després del TH i pot progressar, en 3-6 mesos, a fallida hepàtica (amb la conseqüent pèrdua de l'empelt si no s'administra tractament). Histològicament, l'hepatitis colestatàtica es caracteritza per: visualització de pigment biliar en els casos aguts, balonització cel·lular, baixa inflamació i resposta immunològica intrahepàtica dels limfòcits Th2, el que suggereix que les lesions del fetge es deuen als efectes citopàtics causats directament pel VHC (51).

Tot i que s'han descrit casos en què el virus ha estat eliminat de forma espontània després del TH, la persistència de la infecció deguda majoritàriament als tractaments immunosupressors és el més habitual. L'activació de cèl·lules estrellades i l'accelerat dipòsit de fibra són les conseqüències finals de la infecció del nou òrgan, essent l'evolució clínica de la malaltia més ràpida que la infecció per VHC en el pacient immunocompetent (52). Histològicament la recurrència de la infecció és present a la majoria dels casos un any després del TH, moment en el qual un 11-37% dels individus tenen un grau de fibrosi moderat (53). S'han descrit diversos factors que augmenten el risc de la recurrència de la cirrosi i la pèrdua de l'empelt (**Taula 1**), però l'ús de fetges procedents de donants d'avançada edat és l'element que més influència té en relació a l'accelerat dipòsit de fibra de col·làgen. L'evolució de l'empelt millora notablement si s'aconsegueix erradicar el virus mitjançant la teràpia antiviral pre i post-TH (54). El problema rau en què els

pacients en llista d'espera tenen poca tolerància als tractaments existents i a què, a la població post-trasplantada, se li associa una baixa eficàcia i molts afectes adversos (55).

Taula 1: Factors associats amb la severitat de la malaltia pel VHC i la pèrdua de l'empelt (55).

Factors	Severitat de la malaltia	Supervivència de l'empelt
<i>Relacionats amb el RECEPTOR</i>		
Edat avançada	-	++
Raça africana-americana	++	++
Sexe femení	++	++
Coinfecció VIH	+	++
Genotip CT/TT IL28B	++	
<i>Relacionats amb el DONANT</i>		
*Edat avançada	++	+++
*Donació després de mort cardíaca		
* Genotip CC IL28B	++	
<i>Relacionats amb el VHC</i>		
CV pre-TH elevada	+	+
Genotip 1b	+/-	+/-
<i>Relacionats amb el TH</i>		
*Temps d'isquèmia calenta	+/-	+/-
*Temps d'isquèmia freda	+	++
*Episodis tractats de RCA	+++	++
*Infecció aguda per	+++	++
*Resistència a la insulina/ diabetis	++	-

*Riscs potencialment modificables

RCA: rebuig cel·lular agut

1.6 VHC i tractament

La teràpia antiviral es pot administrar abans del TH, per suprimir la replicació del virus i reduir el risc de recurrència de la infecció en el nou empelt, o bé després del TH, per prevenir la progressió de la malaltia. Fa més de 10 anys que el tractament estàndard de l'hepatitis crònica pel VHC es basa en l'administració, durant 24 ó 48 setmanes, de la combinació d'interferó alfa pegilat (IFN-PEG) i RBV.

Els IFNs són proteïnes produïdes de forma natural pel sistema immunitari en resposta a agents patògens i cèl·lules canceroses. El seu nom es deu a la capacitat que tenen d'interferir en la replicació viral, unint-se a determinats receptors de superfície cel·lular i activant diferents vies de senyalització que regulen la transcripció de gens encarregats d'inhibir la replicació d'una gran varietat de virus ARN i ADN. A més, també activen cèl·lules del sistema immunitari (macròfags i cèl·lules NK) i dinamitzen la presentació d'antígens als limfòcits T. La forma pegilada de l'IFN permet que sigui més estable dins l'organisme, el que confereix més temps d'acció i permet disminuir la seva dosificació. La RBV és un nucleòsid sintètic amb capacitat d'inhibir la replicació viral.

Aquesta teràpia permet assolir unes taxes de RVS (nivells d'ARN indetectables 24 setmanes després d'haver finalitzat el tractament) d'un 80 a un 40-50% dels pacients infectats pels genotipus 2-3 i 1 respectivament (56). Però tan sols un petit grup de pacients en llista d'espera pel TH són capaços de tolerar el tractament, ja que s'associa a greus efectes secundaris (especialment en casos on existeix descompensació o cirrosi avançada), impeding-ne la continuïtat (57, 58).

Darrerament els avanços en el coneixement del cicle de vida del VHC han permès el descobriment de noves dianes terapèutiques fent possible el desenvolupament de nous fàrmacs dissenyats específicament contra el VHC. L'any 2011 l'Administració d'Aliments i Fàrmacs dels EUA (*USA Food and Drug Administration, FDA*) va aprovar l'ús de dues drogues d'administració oral amb capacitat d'inhibir la proteasa NS3/4A: boceprevir (59) i telaprevir (60). Aquests fàrmacs, en combinació amb IFN-PEG/RBV, estan dirigits a tractar el genotip 1 del VHC i han elevat la taxa de guarició al 70-80%, reduint significativament la durada del tractament (61). Tot i així, aquests règims encara tenen limitacions importants: 1. augmenten els efectes secundaris adversos associats a la teràpia (anèmia, rash,

disgeussia...); 2. requereixen del seguiment d'una pauta d'administració complexa i incrementen significativament el consum diari de pastilles; 3. es limiten al tractament del genotip 1; i 4. degut a mutacions properes al centre actiu de la proteasa NS3 es seleccionen fàcilment mutants resistents (62). És per això que la necessitat urgent de desenvolupar tractaments més curts, lliures d'IFN, de fàcil administració, amb més tolerabilitat, amb un ampli espectre d'acció i que no generin resistències ha fet aparèixer, darrerament, una gran quantitat de noves molècules dirigides contra enzims i proteïnes del VHC (Antivirals d'Acció Directa, AAD) o bé que tenen com a diana proteïnes de la cèl·lula hoste (Agents Dirigits contra l'Hoste, ADH).

Virtualment tots els passos del cicle de vida del VHC poden ser dianes terapèutiques per un o més fàrmacs, el que fa que hi hagi en desenvolupament preclínic i clínic un elevat nombre d'AADs i ADHs. Tot i així, només les molècules dirigides al processament de la poliproteïna (ex: inhibidors de la proteasa NS3-4A) i inhibidors de la replicació viral a través de diverses dianes i mecanismes (ex: anàlegs nucleòsids/nucleòtids inhibidors de la polimerasa d'ARN dependent d'ARN *-RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp-, inhibidors no nucleòsids de la RdRp, inhibidors de la NS5A, inhibidors de la ciclofil·lina, antagonistes del micro ARN-122, -MIR-122-) estan aconseguint els resultats més prometedors. Però tot i la gran capacitat antiviral de molts d'aquests compostos, la monoteràpia amb AADs imposa una pressió selectiva que condueix a la ràpida aparició de mutants resistents, el que indica que els règims amb AADs s'han de basar en l'ús conjunt de múltiples drogues amb diferents perfils de resistència (63).

1.6.1 Agents Antivirals Directes (AADs)

1.6.1.1 Inhibidors de la Proteasa NS3-4A (IP)

Els inhibidors de la proteasa bloquegen l'acció enzimàtica de NS3-4A inhibint la replicació viral. Es poden dividir en tres grans categories: 1. pèptids lineals que s'uneixen de forma covalent i reversible al centre actiu de l'enzim; 2. pèptids lineals d'unió no covalent i 3. inhibidors macrocíclics. Els IP de primera generació, com telaprevir/INCIVEK® (Vertex Pharmaceuticals) i boceprevir/VICTRELIS®

(Merck & Co.), tenen una activitat antiviral potent contra el genotip 1 del VHC però mostren un espectre d'acció molt restringit cap a altres genotipus (especialment el genotip 3), baixa barrera de selecció de mutants i propietats farmacocinètiques subòptimes (es requereixen dosis cada 8h) (64). Els IP de segona generació es diferencien dels primers perquè tenen menys efectes adversos, requereixen dosis menys freqüents i tenen un espectre d'acció més ampli (incloent-hi el genotip 3) (65).

1.6.1.2 Inhibidors de la polimerasa NS5B (RdRp)

1.6.1.2.1 Anàlegs de nucleòsids/nucleòtids

Aquests inhibidors anàlegs de nucleòsids/nucleòtids mimetitzen els autèntics substrats que la polimerasa NS5B utilitza per formar les cadenes d'ARN, truncant la seva síntesi després de la incorporació d'un dels anàlegs. Els anàlegs de nucleòtids actuen més ràpidament que els anàlegs nucleòsids ja que per a la seva activació es necessiten dos i tres passos de fosforilació respectivament.

Donat que el centre actiu de la polimerasa NS5B està molt ben conservat, les diferents drogues en desenvolupament són efectives per a tots els genotipus i subtipus del VHC i es caracteritzen per una elevada barrera al desenvolupament de resistències (66). Actualment l'anàleg nucleòtid en fase de desenvolupament més avançada és sofosbuvir (GS-7977, Gilead), el qual s'ha vist que administrat juntament amb RBV permet assolir taxes de RVS del 88% (67).

1.6.1.2.2 Anàlegs no nucleòsids

Els anàlegs no nucleòsids són un grup de drogues molt heterogeni que poden unir-se a un dels quatre llocs al·lostèrics de la polimerasa NS5B. Aquesta unió modifica l'estructura en tres dimensions (3D) de l'enzim, alterant la seva funció catalítica i bloquejant la replicació de l'ARN. A diferència dels anteriors inhibidors, aquests no competeixen amb els substrats nucleòtids trifosfat (NTPs), inhibint la polimerasa abans que es comenci a donar la reacció d'elongació (68). La seva acció antiviral es restringeix al genotip 1 del VHC i han demostrat tenir una baixa barrera a la

selecció de mutants resistents. El fàrmac més avançat dins d'aquest grup és l'ABT-333 (AbbVie).

1.6.1.3 Inhibidors de NS5A

Els inhibidors de NS5A s'uneixen al domini I de la proteïna i bloqueigen la seva capacitat per regular la replicació de l'ARN als complexos de replicació. Tot i que encara no es coneixen amb exactitud els mecanismes d'acció d'aquests fàrmacs, la capacitat que tenen d'inhibir la hiperfosforilació de NS5A (69) causaria la seva redistribució a altres localitzacions cel·lulars diferents a les xarxes membranoses afectant, així, les seves funcions (70). També està descrit que interfereixen en la unió de NS5A i l'enzim fosfatidilinositol 4-quinasa classe III tipus α (*Class III Type α Phosphatidylinositol 4-Kinase*, PI4III α), impedit la formació dels compartiments membranosos de replicació donat que no es pot catalitzar la síntesi de fosfatidilinositol 4-fosfat (*Phosphatidylinositol 4-Phosphate*, PI4P), element indispensable per a la seva formació (71).

Actualment existeixen 13 potents inhibidors de NS5A avaluats en assaigs clínics, d'entre els quals hi ha tres compostos que estan en fase III de desenvolupament: Ledipasvir (GS-5885, Gilead), ABT-267 (AbbVie) i Daclatasvir (BMS-790052; Bristol-Myers Squibb) (72). Aquest darrer compost ha demostrat ser molt potent en cultiu cel·lular i tenir cobertura pangentípica, però la barrera de selecció de mutants resistents és baixa (73). Actualment és l'inhibidor en fases de desenvolupament més avançat i els assaigs clínics realitzats han permès obtenir resultats molt prometedors.

1.6.1.4 Inhibidors de core

L'assemblatge del virió s'inicia amb la oligomerització de core a la superfície de les gotes lipídiques (*lipid droplets* o LD). Matsumura T i col·laboradors (74) han demostrat que la 25-hydroxivitamin D(3) inhibeix la formació de partícules virals a nivell d'assemblatge però es desconeix el mecanisme d'acció i la potencia és relativament baixa. Ni F (75) i Kota S (76) han identificat diferents molècules de petit tamany (SL209 i SL201) amb capacitat d'inhibir en cultiu cel·lular la

dimerització de core i, en conseqüència, la replicació viral. Tot i que encara cap droga dirigida a la proteïna core ha arribat a la fase d'assaig clínic, l'assemblatge del VHC és una diana molt interessant ja que impediria la disseminació del virus a través del fetge.

1.6.1.5 Inhibidors de p7

La viroporina p7 és una proteïna transmembrana que forma canals catiónics. Està demostrat que és essencial per la producció, l'assemblatge i l'alliberament de partícules virals infeccioses (77). Adamantes (amantadina i rimantadina) són fàrmacs que es van aprovar 40 anys enrera pel tractament del virus de la grip A donada la capacitat d'inhibició dels canals iònics M2. Recentment Griffin i col·laboradors (78) han demostrat *in vitro* que la unió d'amantadina als canals iònics de p7 també és capaç de bloquejar la seva obertura. Actualment existeixen altres drogues en desenvolupament basades en sucres nitrogenats (79) que impedeixen l'oligomerització del canal p7 i n'inhibeixen la seva funció. Tot i així, la sensibilitat de p7 a aquestes drogues és genotip dependent, el que indica que és una diana terapèutica difícil degut a la seva elevada variabilitat de seqüència.

1.6.1.6 Inhibidors de NS4B

La proteïna NS4B és la principal responsable de la formació de les xarxes membranoses així com de l'assemblatge d'altres proteïnes no estructurals (NS) als llocs on es dona la replicació viral. Existeixen dues classes de drogues que bloquegen l'acció de NS4B mitjançant diferents mecanismes d'acció: 1. els que inhibeixen la unió de NS4B a l'ARN del VHC (ex: clemizole) (80) i 2. els que interrompen les interaccions de NS4B amb les xarxes membranoses (ex: anguizole) (81). Cap dels dos grups de molècules tenen acció pangentípica i resultats preliminars mostren que la seva acció és més eficaç quan s'administren de forma combinada amb IFN-PEG/RBV.

1.6.1.7 Inhibidors de l'IRES

El lloc intern per a l'entrada del ribosoma (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) és una seqüència altament conservada dins de la regió no traduïda de l'extrem 5' del genoma del VHC que representa un blanc atractiu per a les estratègies basades en la ruptura de seqüències específiques. Amb aquesta finalitat, existeixen diferents maneres de bloquejar els llocs d'entrada del ribosoma: 1. mitjançant l'ús d'oligonucleòtids antisentit, seqüències complementàries al genoma viral que poden inhibir la traducció de proteïnes (AVI-4065 de BioPharma); 2. administrant ribozimes, petites molècules d'ARN amb activitat endoribonucleasa (heptazime o RPI-13919, de Ribozyme Pharmaceuticals, actualment s'ha retirat degut als seus efectes adversos i toxicitat); 3. mitjançant l'ús de petits ARN d'interferència (SIRNA-034RNAi), fins ara només estudiats en assaigs preclínic de laboratori (82).

1.6.1.8 Anticossos neutralitzants contra l'embolcall del virus

Estudis realitzats amb ximpanzés i amb sèrums de pacients infectats han demostrat que els anticossos neutralitzants poden protegir contra la infecció pel VHC o reduir la severitat de la malaltia. El potencial d'aquests, però, es veu reduït *in vivo* donats els múltiples mecanismes que té el virus per escapar del sistema immunitari de l'hoste: 1. L'elevada variabilitat de la regió hipervariable 1 (RHV1) d'E2, a partir de la qual es generen la majoria dels anticossos neutralitzants, disminueix la capacitat dels mateixos alhora de neutralitzar diferents soques del VHC; 2. L'associació del virus a glicoproteïnes i els llocs de glicosilació d'E2 oculten importants dominis funcionals, disminuint la immunogenicitat i impeding l'accés als epítops; 3. El mecanisme de transmissió cèl·lula-cèl·lula permeten evadir fàcilment la resposta immunitària. Finalment, també s'ha descrit que la presència d'anticossos d'interferència pot perturbar l'acció dels anticossos neutralitzants (83). Tot i així, durant els darrers anys el potencial terapèutic dels anticossos monoclonals i neutralitzants ha anat prenent força tal i com mostren diferents estudis en models animals (84-87).

1.6.2 Agents dirigits contra l'hoste (ADH)

1.6.2.1 Inhibidors de la ciclofil·lina A (CypA)

Les ciclofil·lines són proteïnes cel·lulars que faciliten el plegament de proteïnes. S'expressen en diversos teixits i tenen un paper fonamental en el cicle de replicació del VHC mitjançant la unió a NS5A i a la RdRp. La ciclofil·lina A (*Cyclophilin A* o CypA) s'encarrega de la isomerització *cis/trans* dels dominis 2 i 3 de la proteïna NS5A, estimulament la seva unió a l'ARN del VHC. Alisporivir (Deb-025, Novartis), un inhibidor de l'activitat de la CypA capaç d'interferir en la unió CypA/NS5A, s'associa a una inhibició significativa de la replicació viral. A més, es caracteritza també per tenir un efecte pangotípic i una baixa taxa d'aparició de mutants, el que fa que es generin poques resistències (88). Actualment aquest fàrmac és l'ADH que es troba en desenvolupament clínic més avançat (fase III). Altres inhibidors de ciclofil·lina en desenvolupament són SCY-635 (Scynexis) i NIM811 (Novartis) (89, 90).

1.6.2.2 Antagonistes del micro ARN-122 (MIR-122)

El MIR-122 és un ARN que s'uneix a l'extrem 5' del genoma del VHC promovent la replicació i traducció viral (91). Diferents estudis han demostrat que Miravisen (SPC3649, Santaris Pharma A/S), és un oligonucleòtid antisentit amb una potent activitat antiviral tant *in vitro* com *in vivo* (92). L'ús d'aquest fàrmac com a mesura terapèutica pot arribar a ser molt avantatjós donat que MIR-122 és fetge específic i es dirigeix a seqüències conservades entre els diferents genotipus del VHC. A diferència de les anteriors drogues descrites, MIR-122 s'ha d'administrar per via parenteral.

1.6.2.3 Inhibidors de la quinasa fosfatidilinositol-4 (PI4K)

La infecció pel VHC provoca el reclutament de PI4KIII α a les xarxes membranoses on té lloc la replicació viral, el que resulta en una marcada alteració de la distribució cel·lular de PI4P: s'empobreix la membrana plasmàtica i s'enriqueixen

les membranes intracel·lulars on té lloc la replicació viral (93). Recentment s'ha demostrat que les molècules PIK93 i AL-9 poden inhibir l'activitat enzimàtica de PI4KIII α (93, 94). Tot i que l'opció d'inhibir l'activitat enzimàtica de PI4KIII α pot ser eficient, una altra alternativa és bloquejar la seva interacció amb NS5A, implicant la formació de les xarxes membranoses i restaurant el metabolisme de PI4P.

1.6.2.4 Inhibidors de la diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (DGAT1) i la Proteïna Microsomal Transportadora de Triglicèrids (MTP)

L'alliberament del virus depèn de les rutes de secreció de les proteïnes de molt baixa densitat (*Very Low Density Lipoprotein*, VLDL). Dues molècules clau en aquest procés són la diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (*diacylglycerol O-acyltransferase 1*, DGAT1) (95) i la proteïna microsomal transportadora de triglicèrids (*Microsomal triglyceride transfer protein*, MTP) (96). DGAT1 interacciona amb core i el condueix cap a la superfície de les LD. En cultiu cel·lular s'ha demostrat que la inhibició de l'activitat de DGAT1 impedeix la producció de partícules virals infeccioses (95), el que suggereix que pot ser un bon candidat com a diana terapèutica. Els inhibidors de MTP també són una bona alternativa ja que impedeixen la producció de partícules virals *in vitro*. S'ha demostrat que la naringenina, un flavonoide present en els cítrics, inhibeix la secreció de l'apilipoproteïna B (ApoB) mitjançant la inhibició de l'activitat de MTP i la transcripció de determinats enzims implicats en el metabolisme lipídic (97).

1.6.2.5 Inhibidors dels receptors d'entrada del VHC

Les estratègies per inhibir l'entrada prenen especial importància en el marc del TH ja que permetria impedir la recurrència del virus en aquells pacients receptors d'un nou òrgan. Diferents estudis han demostrat l'eficàcia del bloqueig dels receptors d'entrada: cluster de diferenciació 81 (CD81), receptor escombriaire classe B tipus I (*Scavenger receptor class B member 1*, SR-B1) i claudina-1 (CLDN1) tant *in vitro* com *in vivo* mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals (83, 98-102). Actualment s'està testant la tolerabilitat i eficàcia de la molècula ITX 5061

(iTherX), un antagonista d'SR-B1 (103, 104). Els receptors d'entrada del factor de creixement epidèrmic (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) i d'efrines tipus A (*ephrin type-A receptor 2*, EphA2) també poden ser inhibits mitjançant l'ús de fàrmacs actualment comercialitzats per tractar altres malalties: 1. Erlotinib (inhibidor d'EGFR), pel tractament de diversos tipus de càncer; i 2. Desatinib (inhibidor d'EphA2), pel tractament de la leucèmia. Ambdós compostos són capaços d'inhibir la funció quinasa de les seves dianes i han donat resultats prometedors en quan a la inhibició de l'entrada i la transmissió cèl·lula-cèl·lula del VHC (105). De la mateixa manera, Ezetimibe (inhibidor d'NP1CL1), un fàrmac àmpliament comercialitzat pel tractament de la hipercolesterolèmia, ha demostrat tenir potents propietats antivirals *in vitro* i *in vivo* independentment del genotip del virus C (106).

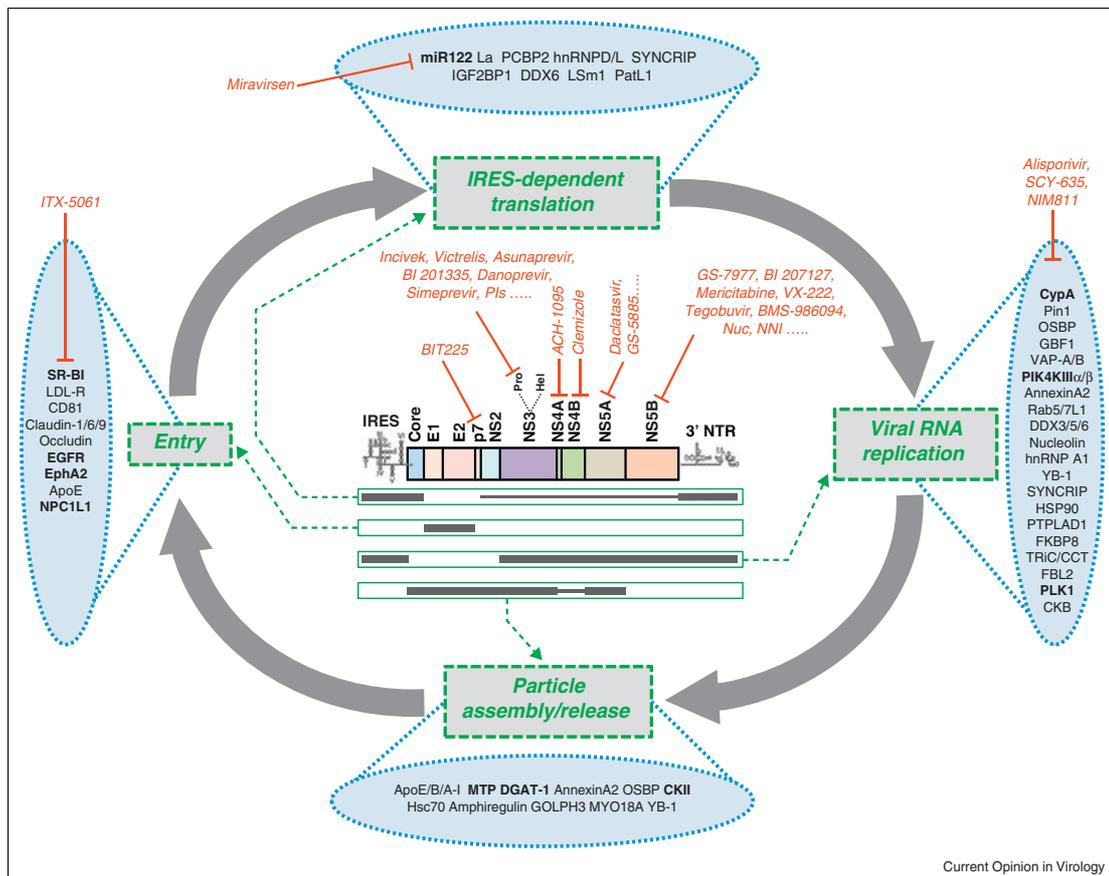


Figura 7: Representació esquemàtica del cicle de vida del VHC i reguladors de la cèl·lula hoste. En les el·lipses blaves s'indiquen factors de l'hoste implicats en l'entrada, la traducció, la replicació i l'assemblatge del VHC. Els noms en negreta representen dianes terapèutiques per les quals s'han trobat inhibidors farmacològics que afecten el procés del cicle de vida en el qual estan implicades. Les línies grises groixudes i primes simbolitzen els components del VHC que tenen un rol més o menys important en cada un dels passos del cicle de vida (indicat en fletxes verdes), respectivament. En vermell es mostren els AADs i els ADHs actualment en fase clínica II, III i IV. Imatge de Chatel-Chaix *et al.* (63).

1.7 Biologia Molecular del VHC

El VHC pertany a la família *Flaviviridae*, que inclou patògens que afecten humans i animals. La família *Flaviviridae* està composta per tres gèneres diferents: els pestivirus, entre els quals es troba el virus de la pesta porcina; els flavivirus, principals causants de malalties virals transmiseses per artròpodes (com el dengue o la febre groga); i els hepacivirus, amb tres membres diferenciats: el virus de l'hepatitis C, l'hepacivirus de rosegadors i l'hepacivirus caní/equí (107).

Fins al dia d'avui no ha estat possible resoldre l'estructura del VHC, però diferents estudis evidencien que probablement no tingui masses semblances amb altres membres de la família *flaviviridae*. Les primeres anàlisis de microscòpia electrònica fetes amb partícules virals obtingudes del sèrum de pacients i ximpanzés infectats han permès veure partícules pleomòrfiques de mides molt heterogènies al voltant dels 30-80 nm de diàmetre (108-113). Més recentment el desenvolupament de sistemes de cultiu cel·lular ha permès visualitzar partícules espiculades amb dos diàmetres clarament diferenciats: unes de 30-35 nm, corresponents a la nucleocàpside del virus, i d'altres entre 50-60 nm, les quals pertanyen probablement als virions infecciosos (114, 115) (**Figura 8**). Les partícules virals existeixen, tant *in vivo* com *in vitro*, com una barreja de partícules infeccioses i no infeccioses en ràtios que van de 1:100 a 1:1000. Les formes extracel·lulars infeccioses tenen una densitat mitjana inferior que les no infeccioses, i anàlisis mitjançant sedimentació per equilibri indiquen que les partícules amb una densitat de flotació d'entre 1.10 g/mL i 1.14 g/mL presenten els ratios d'infectivitat més alts (116). Aquestes diferències en densitats i infectivitats s'atribueixen a la presència de lipoproteïnes de l'hoste (apoE, apoB, apoC1, apoC2 i apoC3) i a complexos d'immunoglobulines que s'uneixen a les partícules virals en circulació, tot i que també existeix la forma lliure del virió (117).

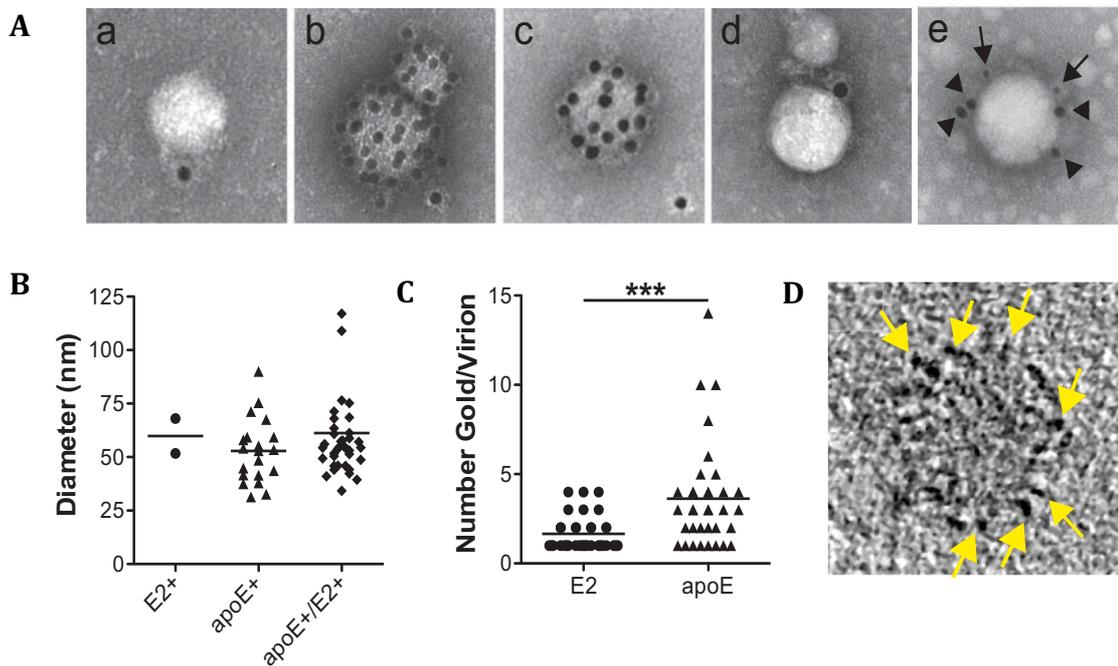


Figura 8: A). Imatges representatives de partícules virals purificades i marcades amb or contra a). glicoproteïna E2; b). apoE; c). apoA-I; d). apoB; e). marcatge doble per E2 (or de 8 nm, fletxes) i apoE (or de 18 nm, triangles). B). Mides de les partícules E2-positives (n= 2; mitjana= 60 nm), apoE-positives (n= 20; mitjana= 53 nm) o E2- i apoE-positives (n= 38; mitjana= 61 nm). C). Nombre de partícules d'or E2 o apoE reactives per virió (**P= 0.0003). D). Secció d'una reconstrucció tomogràfica 3D on s'indiquen les espícules de la partícula viral. Imatge adaptada de Catanese *et al.* (115).

El virus consta d'un embolcall lipídic en què es situen les glicoproteïnes E1 i E2. La nucleocàpside està formada per la proteïna core i per una única molècula d'ARN genòmic de polaritat positiva d'aproximadament 9,6 kilobases (9024 i 9111 nt en funció del genotip). Aquesta molècula conté un únic marc de lectura obert que codifica per una poliproteïna precursora de 3010-3037 aminoàcids (118). Les proteïnes estructurals, les quals formen la partícula viral, estan localitzades a la regió amino terminal en el següent ordre: core, E1 i E2 i estan separades de les proteïnes no estructurals per un petit pèptid de membrana denominat p7 (119). Seguidament es troben les proteïnes no estructurals: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (120) (**Figura 9**). El genoma viral està flanquejat per les regions no traduïdes (*non coding regions*, NC) que es troben en els extrems 5' i 3'. La regió NC de l'extrem 5' està altament conservada, consta de 341 nt i forma estructures secundàries i terciàries estables. Aquesta conté senyals de replicació essencials per

a l'inici de la síntesi dels intermediaris replicatius d'ARN que serveixen de motlles per a la replicació del virus i, alhora, és molt important per a l'inici de la traducció, ja que constitueix el lloc de reconeixement ribosomal. Estudis recents han descrit que el MIR-122 (específic del fetge) és capaç d'unir-se a l'extrem 5' promovent la replicació i traducció del virus (121), convertint-lo així en una interessant diana terapèutica. La regió NC de l'extrem 3' consta d'una seqüència poc conservada d'aproximadament 40 nucleòtids (nt), una regió polipirimidínica poli(U/UC) de 30 a 150 nt i una seqüència terminal única de 98 nt o cua-X (122). L'extrem 3' es creu que juga un paper important en l'inici de la replicació i s'ha relacionat, també, amb l'encapsidació de l'ARN (**Figura 9**).

La traducció del marc de lectura dóna lloc a una poliproteïna d'aproximadament uns 3000 aminoàcids (aa) la qual és processada per proteases de l'hoste i del virus. Les proteïnes estructurals del VHC són produïdes per talls mitjançant una peptidasa senyal cel·lular i les proteïnes no estructurals són processades per proteases virals (**Figura 9**).

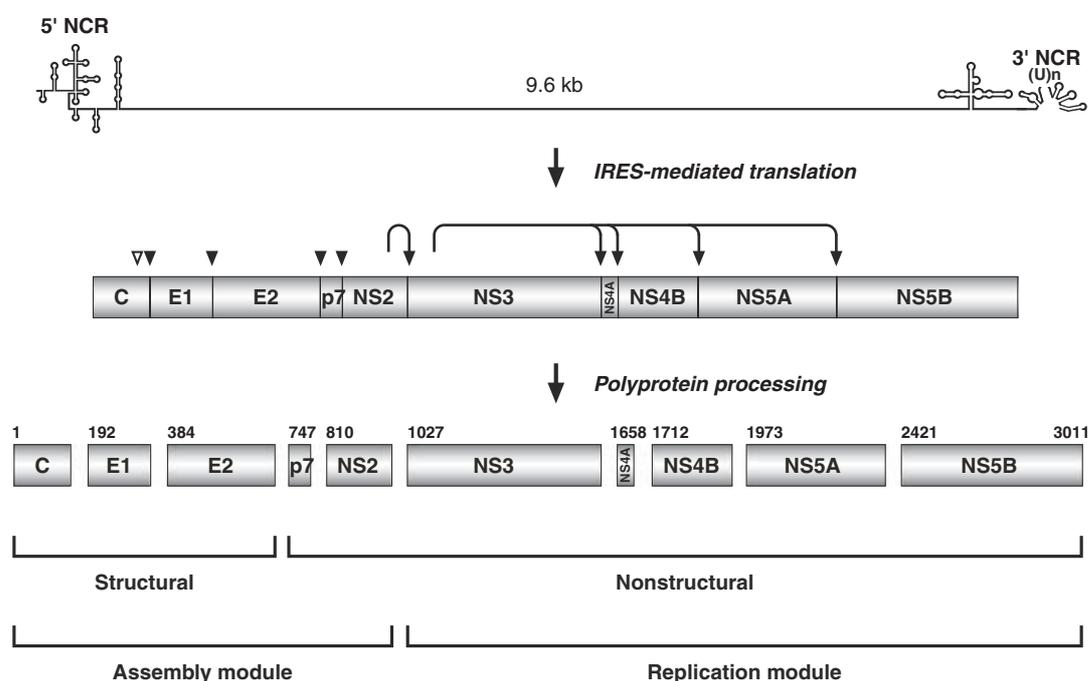


Figura 9: Esquema de la organització genòmica i productes gènics del VHC. A dalt, estructura de la cadena d'ARN de polaritat positiva amb les estructures secundàries als extrems 5' i 3' no codificants (NCR). La traducció dóna lloc a un precursor polipeptídic que serà processat donant lloc a les proteïnes estructurals i no estructurals. Els triangles negres indiquen els llocs de tall de la peptidasa senyal del RE; el triangle blanc indica el lloc de processament de la proteïna core pel pèptid peptidasa senyal. Les fletxes indiquen els llocs de tall de NS2 i NS3-4A. Es mostra, també, el número d'aa de cada proteïna. Moradpour *et al.* (123).

1.7.1 Proteïna Core

La proteïna core madura té al voltant de 177 aa i un pes aproximat de 21kDa. La seqüència nucleotídica de la regió codificant està altament conservada entre els diferents genotipus. La proteïna consta de dos dominis, el D1 (de l'aa 1-117) i el D2 (de l'aa 118 al 177). El domini D1 té activitat xaperona, requerida per al remodelatge i empaquetament de l'ARN genòmic dins la partícula viral, i està involucrat en interaccions amb nombrosos factors cel·lulars, contribuint a alterar funcions de la cèl·lula hoste (124). El domini D2 conté dues hèlix amfipàtiques responsables de dirigir la proteïna a la superfície citoplasmàtica del reticle endoplasmàtic (RE) i a la monocapa de les LD, encarregant-se així de l'associació de core amb partícules citosòliques d'origen lipídic (125) que serveixen de plataforma per a l'assemblatge del virus. El processament del fragment transmembrana per part d'una peptidasa resident al RE i posteriorment pel d'una peptidasa citosòlica, permeten l'alliberació de la proteïna core madura (**Figura 10**). Core es localitza predominantment al citoplasma cel·lular tot i que en funció del tamany de la proteïna s'ha vist que pot tenir una distribució nuclear (estudis *in vitro* demostren que d'aquesta manera core podria interactuar amb protooncogens, motiu pel qual se l'associa amb el desenvolupament de carcinoma hepatocel·lular en pacients amb infecció crònica pel VHC) (126).

Existeix un marc de lectura obert alternatiu dins la regió de core on es codifica per una altra proteïna denominada: proteïna de marc de lectura alternatiu (*Alternative Reading Frame Protein, ARFP*), proteïna F (*frameshift*) o core+1. És una proteïna quimèrica que conté els aa dels extrems N- i C-terminal de core i una part central codificada per el marc de lectura +1 (originada a partir del desplaçament del marc de lectura del ribosoma). Tot i no ser necessària per a la replicació *in vivo* i *in vitro* (127), s'expressa de forma natural durant la infecció ja que en pacients VHC+ s'han trobat cèl·lules T i anticossos específics per a la proteïna F. S'hipotetitza que la proteïna F podria ser responsable d'algunes funcions biològiques atribuïdes a core, doncs en cultiu cel·lular s'ha vist que l'expressió d'F s'associa a la supressió de p21, a l'augment de l'activitat de c-myc, a la modulació de l'expressió de p53, a la perturbació del citoesquelet de tubulina i a la modulació de l'expressió de

citoquines i quimioquines (el que suggereix una possible participació de la proteïna F en les funcions de core relacionades amb el càncer de fetge) (128).

1.7.2 Proteïnes de l'embolcall

E1 (35kDa) i E2 (70kDa) són proteïnes transmembrana de tipus I amb els dominis N-terminals localitzats al lumen del RE, on són glicosilats i plegats degudament, i els dominis C-terminals transmembrana, que ancoren i retenen les proteïnes al RE (**Figura 10**). Les dues posseeixen llocs de glicosilació ben conservats i el patró de carbohidrats consisteix en oligosacàrids complexes, rics en manosa i àcid siàlic. Ambdues formen heterodimers i es situen a l'embolcall de la partícula viral, on estan implicades en: 1. la unió a receptors cel·lulars (i, per tant, en l'entrada del virus dins la cèl·lula); 2. la fusió amb la membrana de l'endosoma i 3. l'assemblatge de partícules virals infeccioses. E1 és capaç d'interaccionar directament amb apoE i apoB (129), el que suposa una avantatge pel virió ja que l'emascament de les glicoproteïnes de l'embolcall permet evadir la resposta del sistema immunitari així com la seva unió a determinats receptors cel·lulars. L'extrem N-terminal d'E2 conté les regions més variables de tot el genoma viral, anomenades RHV1 i RHV2. La RHV1, que comprèn els primers 27 aa d'E2 i que és la que presenta més variabilitat de totes, està situada a la superfície de l'estructura de la proteïna i és una regió immunodominant capaç de promoure la resposta dels anticossos neutralitzants (130). Diversos estudis *in vitro* han demostrat el seu paper en la unió del virió amb els receptors SR-B1 (131) i CD81 (132).

1.7.3 Proteïna p7

El polipèptid p7 és una proteïna intrínseca de membrana de 63 aa (**Figura 8**). És requerida per a la producció de partícules virals infeccioses i juga un paper clau en els processos d'assemblatge i maduració del VHC (133, 134). Té característiques semblants a un grup de proteïnes anomenades viroporines i pot formar canals catiónics en liposomes (135), l'activitat dels quals suggereix que protegirien de l'exposició prematura a pHs àcids durant la maduració i l'alliberament de les partícules virals. Aquesta proteïna no és requerida per a la replicació de l'ARN *in*

vitro però és essencial per a que la infecció sigui productiva *in vivo* (136).

1.7.4 Proteïna NS2

La proteïna transmembrana NS2 (~ 23 kDa) és un polipèptid que conté un domini proteasa del tipus cisteïna que, juntament amb el terç N-terminal de NS3, forma una metaloproteasa dependent de zinc (**Figura 10**). La proteïna NS2 permet el processament proteolític de NS2-NS3 (l'únic substrat que es coneix de la proteasa), essencial per alliberar completament a NS3 i promoure, així, la replicació. Recentment s'ha descrit que el domini proteasa de NS2 (però no la seva activitat) té un paper fonamental en l'assemblatge viral, intervenint en la organització de la complexa xarxa d'interaccions entre proteïnes estructurals i no estructurals (137).

1.7.5 Proteïna NS3-NS4A

NS3-NS4A és un complex no covalent format per NS3 i el cofactor NS4A (**Figura 10**). NS3 (~ 70 kDa) és una proteïna multifuncional amb dues activitats enzimàtiques clarament diferenciades. El domini N-terminal, amb activitat serina-proteasa, està en associació amb el cofactor ancorat a la membrana NS4A (~ 8 kDa) i és responsable de catalitzar el processament de la resta de proteïnes no estructurals en els llocs: NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A i NS5A-NS5B (**Figura 9**). Aquest complex, majoritàriament situat a les membranes del RE i als complexos de replicació, té un paper fonamental en el bloqueig de vies de senyalització antivirals de l'hoste, ja que és capaç d'hidrolitzar Cardif (*Caspase recruitment domain adaptor inducing IFN- β*) i TRIF (*Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β*), el que resulta amb la inhibició de RIG-I (*retinoic-acid inducible gene-1*), un mediador de la senyalització antiviral (138, 139). El domini C-terminal de NS3 presenta activitat ARN helicasa/NTPasa, la qual és capaç de desenrotllar els dúplex d'ARN de forma ATP-depenent (140). L'activitat helicasa de NS3 és essencial per la replicació i l'assemblatge tot i que es desconeixen els mecanismes d'acció (141, 142). Aquest complex, doncs, juga un paper important no només en la replicació i l'assemblatge sinó també en la persistència i la patogènesi del VHC, essent una diana molt interessant per a la

teràpia antiviral.

1.7.6 Proteïna NS4B

NS4B (~ 27 kDa), és una proteïna integral de membrana altament hidrofòbica, amb quatre dominis transmembrana i un extrem N-terminal hèlix- α implicat en la unió a membranes intracel·lulars (**Figura 10**). Tot i que és una molècula poc caracteritzada, es coneix que és capaç d'induir, a partir d'alteracions de la membrana del RE, la formació de xarxes membranoses anomenades *membranous web*, les quals serveixen de bastida pels complexos de replicació i l'assemblatge del virus (**Figura 17**). També s'ha descrit que NS4B té activitat NTPasa i que pot unir-se a l'ARN viral, intervenint en la seva replicació (143).

1.7.7 Proteïna NS5A

NS5A (56-58 kDa) és una fosfoproteïna multifuncional que està ancorada a membrana del RE per la seva hèlix- α N-terminal, cap a la part citosòlica de la bicapa (**Figura 10**). En funció del seu estat de fosforilació adquireix diferent rol en el cicle viral, ja sigui actuant en la replicació de l'ARN o en l'assemblatge de partícules (142, 144). La proteïna està dividida en tres dominis separats per dues seqüències de baixa complexitat (*Low Complexity Sequence I and II*, LCS I i LCS II). El domini I, d'unió a zinc, participa en la unió a les LD (145). El domini II té principalment funcions reguladores a través de la interacció amb nombroses proteïnes cel·lulars (146). Conté una regió conservada de 40 aa anomenada regió determinant de la sensibilitat a l'IFN (*Interferon Sensitivity Determining Region*, ISDR) que modula la resposta a l'interferó mitjançant la repressió de la proteïna quinasa R (*Protein Kinase R*, PKR) (38, 147) i està descrit que, l'acumulació de mutacions en aquesta seqüència, confereix diferent sensibilitat a l'IFN- α (148). Així mateix, a través de la unió a PKR i p53 també és capaç d'inhibir processos d'apoptosi cel·lular (149, 150), el que demostra la seva gran versatilitat i multifuncionalitat en diferents parts del cicle viral, en la regulació del cicle cel·lular, proliferació i modulació de la resposta innata del sistema immunitari. Aquests dos dominis estan principalment involucrats en la replicació mentre que,

el domini III, s'ha vist que és essencial per a l'assemblatge del virió donada la capacitat d'interacció amb la proteïna core (151). Molt recentment s'ha descrit que NS5A és també capaç d'interaccionar amb PI4KIII α , un enzim que es localitza pròxim a les membranes del RE (152, 153) i que catalitza la síntesi de la proteïna integral de membrana PI4P. L'estimulació per part de NS5A de l'activitat quinasa de PI4KIII α eleva els nivells de PI4P, constituent fonamental de les membranes on es formen els complexos de replicació, capaç de reclutar proteïnes virals i de l'hoste requerides per aquest procés. Donat que PI4KIII α contribueix a la replicació de l'ARN del VHC, aquesta pot ser una diana interessant pel desenvolupament d'una teràpia contra el virus.

1.7.8 Proteïna NS5B

NS5B (~ 68 kDa), l'última proteïna del genoma del virus, és una RdRp. Aquesta fosfoproteïna està ancorada a la membrana a través del domini C-terminal de 21 aa (Figura 10) i té la típica estructura de les polimerases (estructura de mà dreta) (154). Aquest enzim és el responsable de la síntesi de la cadena d'ARN de polaritat negativa (o intermediari replicatiu, IR) el qual servirà de motlle per a la generació de la nova progènie viral. NS5B ha estat extensament caracteritzat i és una important diana pel tractament antiviral.

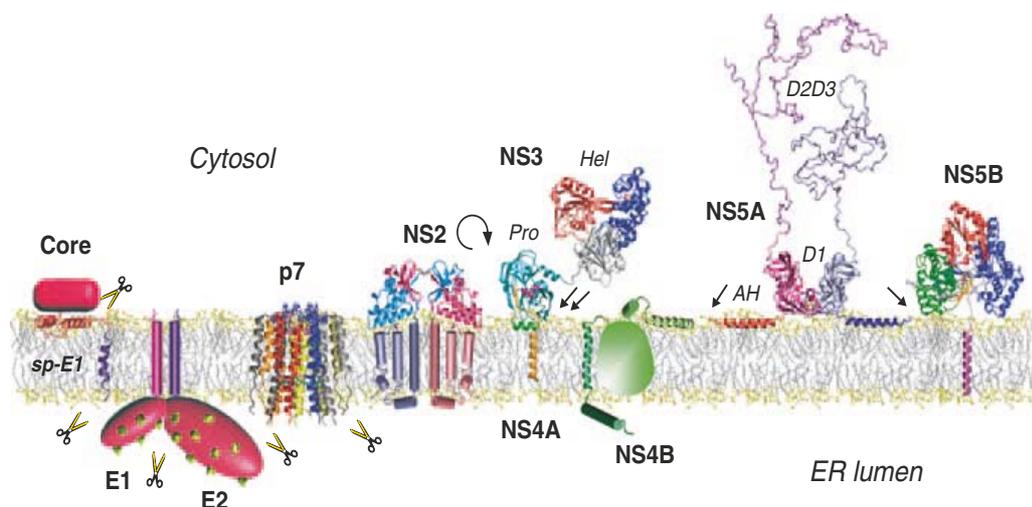


Figura 10: Estructura de les proteïnes del VHC i la seva associació a la membrana. Els elements que encara no s'han resolt es representen com a cilindres o esferes amb les seves mides aproximades. Els punts verds representen llocs de glicosilació de les proteïnes de l'embolcall. Moradpour *et al.* (123)

1.8 Models d'estudi del VHC

1.8.1 Models *in vivo*

El ximpanzé (*Pan troglodytes*) és actualment l'únic model animal que pot ser fàcilment infectat amb el VHC i el qual desenvolupa un curs clínic de la infecció molt semblant al dels humans. Els animals esdevenen virèmics 3-4 dies després de l'exposició al virus, amb pics de CV de 10^5 - 10^7 còpies genòmiques/mL durant la fase aguda de la infecció. Seguidament la persistència del virus fa que acabin desenvolupant la fase crònica de la malaltia, associada a una patologia lleu del fetge (155). Tot i les avantatges que proporcionen els ximpanzés per a l'estudi del VHC, per raons ètiques i econòmiques el seu ús en aquest camp és molt limitat, el que ha forçat la cerca de noves estratègies.

Xie *et al.* (156), van demostrar que les tupaies (*T. belangeri chinensis*) podien ser infectades amb el VHC després de sotmetre-les a forts tractaments d'immunosupressió. En aquest cas, però, la limitació rau en què la infecció no arriba a ser persistent, i només un 25% dels animals infectats assoleixen títols molt baixos de virèmia (10^2 - 10^5 UI/mL) d'una forma intermitent. Un estudi més recent mostra que algunes tupaies poden arribar a desenvolupar esteatosi, fibrosi i cirrosi passats 3 anys des del moment de la infecció inicial (157), el que pot facilitar l'estudi d'aquestes entitats.

Molts grups han intentat establir un model animal amb ratolins fent ús de diverses estratègies. Per un costat, Mercer i col·laboradors (158) van generar el ratolí quimèric SCID-Albu-uPA: mitjançant l'encreuament de ratolins Alb-uPA (*urokinase-type plasminogen activator transgene controlled by an albumin promoter*), els quals expressen una proteïna hepatotòxica, amb ratolins immunodeficients SCID (*severe combined immunodeficiency*), obtingueren ratolins que patien dany hepàtic donada l'expressió fetge-específica del transgen uPA. Amb els ratolins SCID-Albu-uPA es generà les quimeres, trasplantant-los hepatòcits humans que foren capaços d'integrar-se al parènquima hepàtic i repoblar el fetge danyat. Aquests animals són capaços de desenvolupar una infecció persistent amb títols virals elevats després de la inoculació de sèrum de pacients VHC-positius, així com de transmetre la malaltia de forma vertical i horitzontal. I tot i que al ser

animals immunodeprimits no permeten l'estudi de la patogènia del virus, aquest model animal ha permès testar l'activitat antiviral d'alguns fàrmacs (99) i ha servit per mostrar que els anticossos neutralitzants són capaços de prevenir la infecció (159). Per altra banda, i després que Ploss *et al.* (160) demostrés que CD81, SR-B1, CLDN1 i ocludina (OCLN) constitueixen el conjunt mínim de factors de l'hoste involucrats en l'entrada del virus, però que CD81 i OCLN necessiten ser d'origen humà per raons espècie-específiques, Dorner i col·laboradors (85) han generat ratolins genèticament humanitzats: mitjançant l'ús d'adenovirus recombinants que expressen els gens humans de CD81 i OCLN o l'expressió estable d'aquests factors en ratolins transgènics ha permès generar el primer model de ratolí immunocompetent per a estudiar *in vivo* l'entrada del virus dins la cèl·lula i testar l'eficàcia de vacunes i d'inhibidors d'entrada.

1.8.2 Models *in vitro*

Molts investigadors, amb la finalitat d'establir un model de cultiu cel·lular per a la propagació del VHC, han intentat infectar diferents línies cel·lulars d'origen hepàtic o d'altres orígens i espècies animals amb sèrum de pacients VHC-positius. L'èxit d'aquestes aproximacions, però, ha estat bastant limitat ja que en la majoria dels casos la replicació és transitòria i es requereix de tècniques de detecció altament sensibles (RT-PCR) per poder monitoritzar la infecció (161). Donada la poca reproduïbilitat i els baixos nivells de replicació del virus els investigadors han hagut de recórrer a la transfecció de replicons genòmics capaços de replicar de forma autònoma en determinades línies cel·lulars d'origen hepàtic. Les línies cel·lular més permissives a la replicació del VHC *in vitro* són derivades d'hepatoma humà: HepG2, Huh-7 (162) i els seus subclons (Huh7.5 i Huh7-Lunet) (163). La línia cel·lular Huh7 i derivats són les més eficients en la replicació de l'ARN del virus, però tenen l'inconvenient que no són capaces de polaritzar ni expressar marcadors específics dels hepatòcits madurs. Mentre que la línia HepG2, tot i créixer de forma polaritzada i ser capaç de mimetitzar la configuració dels canalicles biliars dels hepatòcits, suporta dèbilment la replicació del VHC (164, 165). Per a solucionar aquest problema, recentment s'ha vist que l'expressió del MIR-122 a la línia cel·lular HepG2 permet la replicació de forma eficient i suporta

el cicle del virus sencer (166). Finalment, els hepatòcits humans primaris (HHP) són el model *in vitro* més proper a la realitat. Tot i així, el seu ús en recerca és limitat ja que són difícils d'obtenir, tenen una elevada variabilitat en funció del donant del que procedeixen i a més, perden ràpidament el seu estat de diferenciació, el que complica els experiments en cultiu.

1.8.2.1 El sistema de les pseudopartícules

El model més explotat per a estudiar l'entrada del virus és sense dubte el sistema de les pseudopartícules virals (VHCpp). Aquest fou desenvolupat paral·lelament l'any 2003 per Bartosch *et al.* (167) i Hsu *et al.* (168) i es basa en la capacitat que tenen els retrovirus d'incorporar glicoproteïnes al seu embolcall. Aquest sistema està basat en la cotransfecció de cèl·lules 293T (cèl·lules embrionàries humanes de ronyó) amb els vectors d'expressió que codifiquen per les glicoproteïnes del virus (E1 i E2), les proteïnes gag i pol (de la càpside i polimerasa) del virus de la leucèmia murina (*Murine Leukemia Virus*, MLV) o el virus de la immunodeficiència humana (VIH) així com el genoma retroviral codificant per un gen reporter (Luciferasa -Luc-, o proteïna verda fluorescent -*Green Fluorescent Protein*, GFP-) i el senyal d'empaquetament. Les VHCpp es secreten al medi de cultiu 48h després de la transfecció, i els sobrenedants que les contenen s'utilitzen per infectar cèl·lules diana (**Figura 11 i 13A**). Una limitació de les VHCpp és que són partícules produïdes a una línia cel·lular no hepàtica (293T) i que l'assemblatge dels retrovirus es dona en compartiments post-Golgi i/o a la membrana plasmàtica. Per tant, l'estreta associació entre les partícules del virus i les lipoproteïnes no es dona, el que pot afectar els estudis relacionats amb els anticossos neutralitzants o als d'entrada associats a receptors lipídics (receptor de lipoproteïnes de baixa densitat -*Low Density Lipoprotein receptor*, LDLr-, SR-B1 i receptor *Niemann-Pick C1-Like1* -NPC1L1-).

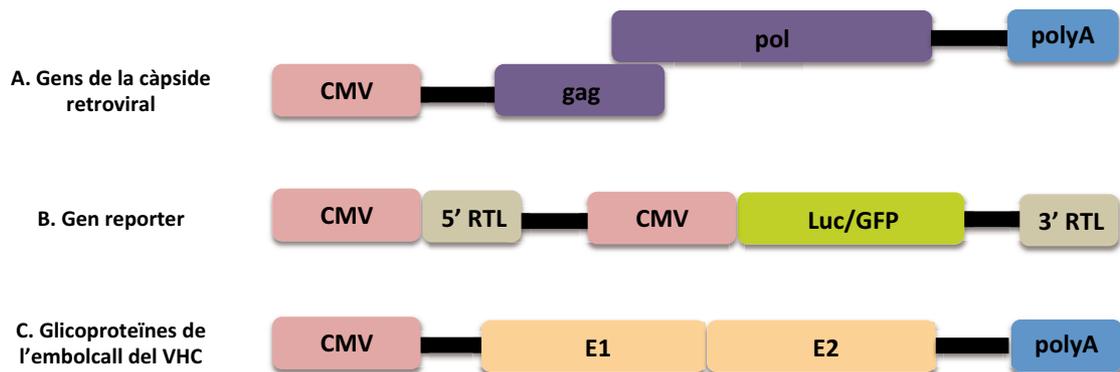


Figura 11: Constructes per a la producció de pseudopartícules. A) proteïnes de la càpside retroviral sota el control del promotor de citomegalovirus (CMV). A l'extrem 3', seqüència de poliadenilació o cua poliA. B) vector que conté el gen reporter (Luc o GFP) sota el control del promotor de CMV i flanquejat per repeticions terminals llargues retrovirals (5' i 3' RTL). C) Glicoproteïnes E1 i E2 de l'embolcall del VHC sota el control del promotor de CMV. A l'extrem 3', seqüència de poliadenilació o cua poliA. Les VHCpp es produeixen mitjançant la cotransfecció dels 3 constructes a les cèl·lules 293T. Els sobrenedants que se n'obtenen es fan servir per infectar cèl·lules Huh7 (o derivats) o per dur a terme estudis de neutralització (ja sigui fent ús d'anticossos contra les proteïnes E1 i E2 o bé contra els receptors d'entrada del VHC). Imatge adaptada de Bartosch *et al.* (167)

1.8.2.2 El sistema del replicó

A fi d'establir un model de cultiu cel·lular capaç de propagar el VHC, l'any 1999 Lohmann *et al.* (169) van generar els primers replicons subgenòmics funcionals. Els replicons són molècules d'ARN amb capacitat autoreplicativa a les quals se'ls hi ha deletat els gens estructurals del VHC (core, E1 i E2), la proteïna p7 i NS2 i se'ls hi ha insertat un marcador de selecció (gen de resistència a la neomicina) sota el control d'un IRES seguit d'un segon IRES que controla l'expressió dels gens NS3-NS5B (**Figura 12A**). La transfecció d'aquests ARNs bicistrònics a la línia cel·lular Huh7 permet la selecció d'aquelles cèl·lules que contenen virus (gràcies a l'addició al medi de G418) els quals són capaços de replicar de forma eficient (**Figura 13B**). Mentre els primers replicons es crearen a partir d'una seqüència consens procedent del genotip 1 del VHC (Con1), amb el temps se n'han generat de nous amb els genotipus 1a, 2a, i 4a que al seu torn contenen diferents gens reporters (Luc o GFP), augmentant enormement la versatilitat d'aquest model d'estudi. Gràcies als replicons subgenòmics s'ha pogut testar nous fàrmacs, identificar

resistències a antivirals (170, 171) i aprofundir en els mecanismes de replicació i la caracterització dels complexos de replicació (172, 173).

Donat que el sistema del replicó subgenòmic no és capaç de produir partícules virals, s'han desenvolupat altres sistemes com ara el VHC_{PTC} (partícules transcomplementades del VHC) (**Figura 13C**) i els replicons genòmics (**Figura 12B, 12C i 13D**). La metodologia VHC_{PTC} es basa en l'empaquetament en *trans* de la molècula d'ARN que codifica les proteïnes per a la replicació mitjançant l'expressió independent de les proteïnes estructurals del VHC. El sistema VHC_{PTC} utilitza virus col·laboradors o bé cèl·lules que expressen les proteïnes estructurals de forma estable (el que evita la competència de l'empaquetament entre l'ARN del VHC i el virus col·laborador) (174-176) permetent l'empaquetament en *trans* dels transcrits d'ARN. Els ARN subgenòmics, amb delecions generalment dels gens que codifiquen per les proteïnes de l'embolcall, s'han trobat de forma relativament abundant al fetge i en sèrum de pacients infectats. Això fa pensar que aquests ARNs són capaços de replicar de forma autònoma i que poden ser empaquetats i secretats gràcies a virus *wild type* que coinfecten la mateixa cèl·lula (177), modulant així la progressió de la malaltia. Només una única ronda d'infecció és possible amb l'ús de VHC_{PTC} en cèl·lules naïve, el que ha conduït a la cerca de noves metodologies capaces de suportar el cicle de vida sencer.

Els primers replicons genòmics que es van crear contenien el genoma complet del virus (*full-length genomes*) amb determinades mutacions que incrementaven la replicació de l'ARN i l'expressió de proteïnes virals. Aquests genomes *full-length*, tot i que replicaven de forma elevada no foren capaços de generar partícules virals infeccioses, suggerint que probablement les mutacions incorporades per promoure la replicació interferien en la producció de la progènie (178). No va ser fins a l'any 2005 que es desenvolupà el model del cultiu cel·lular del VHC (VHC_{cc}) (114, 164, 179) basat en el genoma complet de JFH1 (*Japanese Fulminant Hepatitis 1*) obtingut d'un pacient del Japó que va patir una hepatitis fulminant (180) que va permetre solucionar aquest problema (**Figura 12B**). La transfecció de cèl·lules Huh7 amb l'ARN de JFH1 conduïa a la generació de partícules virals infeccioses tant en cultiu cel·lular, ximpanzé i ratolí (**Figura 13D**). Aquestes partícules han suposat un gran pas per a l'estudi del VHC i s'usen rutinàriament en molts laboratoris per aprofundir en el coneixement del cicle de vida del virus: entrada,

replicació, empaquetament, assemblatge, maduració i alliberament. A partir del replicó genòmic JFH1 s'han pogut construir diferents quimeres, mantenint els gens involucrats en la replicació (des de NS3 fins a NS5B) i incorporant gens procedents d'altres genomes a la regió que va de core fins a NS2 (181-186) (**Figura 12C**). Però tan sols la quimera intragenotípica J6/JFH1 (anomenada Jc1) ha estat capaç de produir títols virals superiors a JFH1 (181). Aquestes quimeres han estat útils per estudiar l'entrada, la neutralització i l'assemblatge de tots els genotipus del VHC coneguts fins ara.

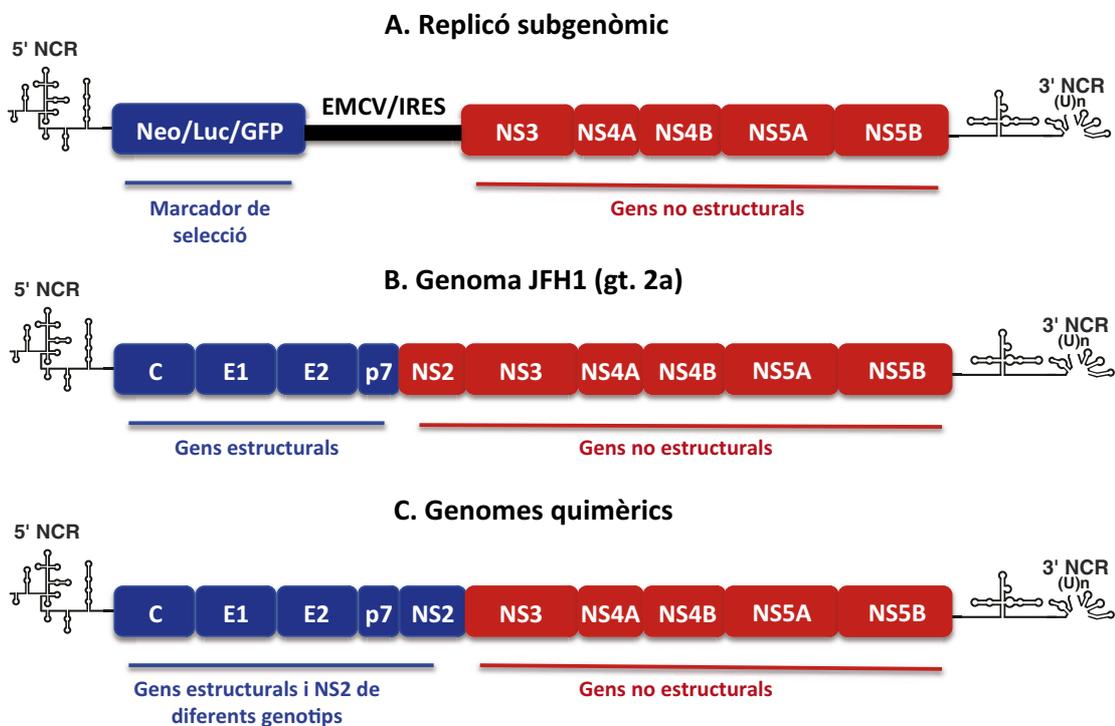


Figura 12: Constructes dels replicons. A). Estructura del replicó bicistrònic subgenòmic, compost per la regió 5' no codificant del VHC que dirigeix la traducció del gen marcador de selecció (gen de la neomicina fosfotransferasa -neo-, gen de la proteïna Luciferasa-Luc- o gen de la proteïna verda fluorescent -GFP-), l'IRES del virus de l'encefalomiocarditis (EMCV), els gens no estructurals NS3 a NS5B i la regió 3' no codificant del VHC. B). Genoma complet de JFH1. C). Genoma quimèric que conté els extrems 5', 3' i la regió NS3-NS5B de JFH1 així com els gens estructurals i la proteïna NS2 d'altres genotipus del VHC. Figura adaptada de Bartenschlager *et al.* (187)

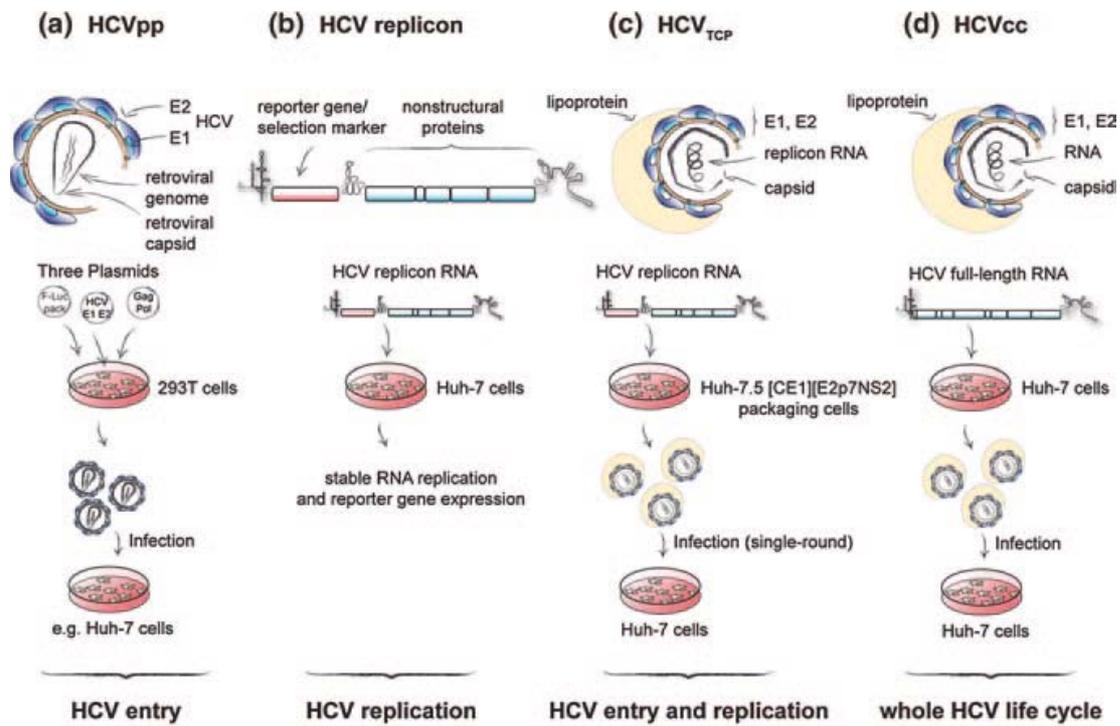


Figura 13: Sistemes de cultiu cel·lular per investigar els diferents passos del cicle de replicació viral. a) VHC_{pp} per l'estudi de l'entrada del virus; b) Replicons subgenòmics per l'estudi de la replicació; c) VHC_{PTC} per l'estudi d'un únic cicle d'entrada i replicació; d) VHC_{cc} per l'estudi del cicle viral complet. Figura de Steinmann *et al.* (188)

1.9 Cicle de vida del VHC

1.9.1 L'hepatòcit: mínima unitat funcional

El fetge està compost per cèl·lules parenquimatoses (hepatòcits) i cèl·lules no parenquimatoses (cèl·lules endotelials sinusoidals, cèl·lules estrellades hepàtiques i cèl·lules de Kupffer). Els hepatòcits constitueixen el 60-70% del total de la massa cel·lular del fetge i tenen un diàmetre de 20-30 μm . Són cèl·lules polièdriques polaritzades disposades en plaques (**Figura 14**) i amb tres costats clarament diferenciats: 1. la **part sinusoidal o basal**, encarada als sinusoids i que forma, juntament amb les cèl·lules endotelials, l'espai de Disse. És en aquesta zona on l'hepatòcit entra en contacte amb la sang i secreta proteïnes o absorbeix substàncies del torrent sanguini; 2. la **part basolateral**, que està en contacte amb altres hepatòcits per formar les làmines hepatocitàries; 3. la **part biliar o apical**, en contacte amb els canalicles biliars i per on els hepatòcits excreten la bilis (**Figura 14**). A fi de mantenir aquesta organització anatòmica, els hepatòcits necessiten diversos tipus d'unions que permetin la integritat del teixit, el contacte i comunicació cèl·lula-cèl·lula i el manteniment de les funcions fisiològiques amb l'entorn que els rodeja. Les unions estretes (*tight junctions*, TJ), una de les principals unions cel·lulars del parènquima hepàtic, es localitzen al llarg dels canalicles biliars i separen la part apical de la part basolateral de la cèl·lula, permetent la formació de la barrera hepato-biliar (**Figura 14**). Aquesta polarització és fonamental ja que separa la bilis de la circulació sanguínia, impedeix la lliure difusió de lípids i proteïnes entre els dos pols i modula el pas paracel·lular de petites molècules i ions (189). Les TJ es componen de tres famílies principals de proteïnes transmembrana: ocludines, claudines i molècules d'unió i adhesió (*Junctional Adhesion Molecules*, JAM) (190, 191).

Durant l'evolució hoste-patògen, els virus han anat trobant la manera d'aprofitar certes molècules característiques d'aquestes unions per entrar dins la cèl·lula i iniciar la infecció. Exemples d'això els trobem amb el virus Cocksackie del grup B i els adenovirus els quals utilitzen el receptor CAR (*Cocksackievirus and Adenovirus Receptor*, receptor del virus Cocksackie i d'Adenovirus), un membre de la superfamília de les immunoglobulines present a les TJ (192, 193). Per altra banda,

hi ha diversos estudis que demostren que el VHC utilitza els receptors claudina-1 i ocludina per a la seva entrada dins la cèl·lula (160, 194, 195), o bé que la pèrdua de la polaritat cel·lular incrementa l'entrada del VHC (165), suggerint que les TJ són el lloc d'entrada del virus dins la cèl·lula alhora que serveixen de barrera física i restringeixen l'accés del virus als receptors.

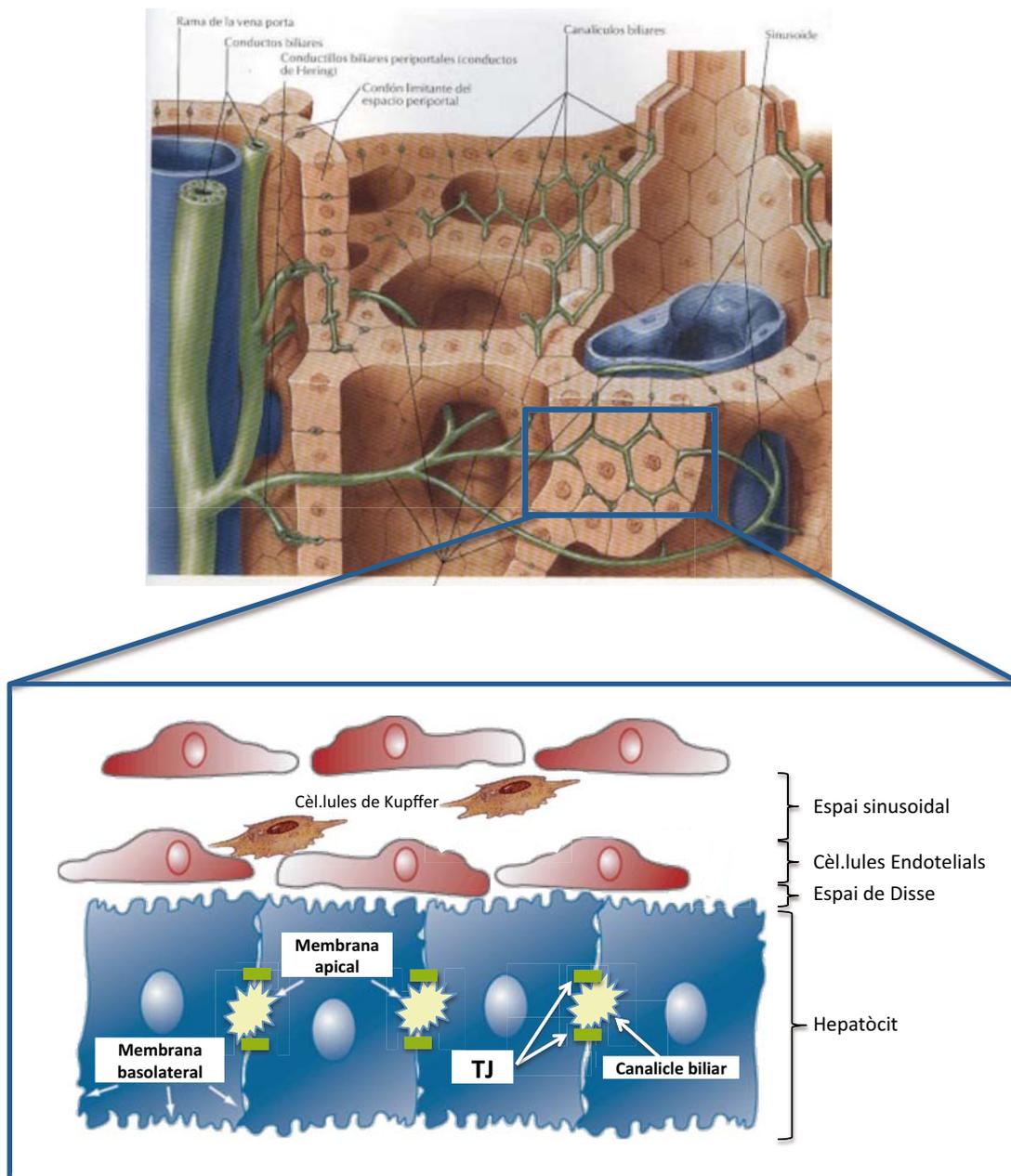


Figura 14. Dominis de membrana dels hepatòcits: la membrana basolateral o sinusoidal està en contacte amb els hepatòcits adjacents i amb la circulació sanguínea que passa per l'espai de Disse i el lumen sinusoidal. Les TJ, on es troben CLDN1 i OCLN, permeten la formació dels canalicles biliares, donant lloc a la membrana apical de l'hepatòcit.

1.9.2 L'entrada del VHC

El VHC circula per la sang dels pacients infectats en associació amb lipoproteïnes. D'aquí que tant aquestes com les glicoproteïnes de l'embolcall puguin contribuir a les primeres interaccions entre el virió i la cèl·lula diana. Dades experimentals indiquen que el virus utilitza una única via d'entrada per iniciar la infecció, la qual es caracteritza per tres passos fonamentals: 1. Unió del virus als hepatòcits; 2. Endocitosi de la partícula viral mediada per receptor i 3. Fusió de l'endosoma. **(Figura 15).**

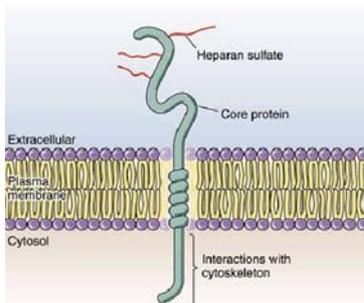
Gràcies al desenvolupament de diversos sistemes *in vitro* per a l'estudi del VHC, s'han pogut identificar alguns receptors clau en l'entrada del virus, un procés altament complex i regulat. La proteïna sE2, la forma soluble de la glicoproteïna E2 en la qual el domini transmembrana ha estat eliminat (196) juntament amb el sistema de les pseudopartícules virals del VHC, han estat extremadament útils en aquest aspecte.

El VHC només infecta a humans i ximpanzés, i els hepatòcits són les principals cèl·lules diana tot i que també s'ha descrit infecció en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) (197), cèl·lules del sistema nerviós central (198) i cèl·lules dendrítiques (199). El virus pot difondre a través de les fenestres de les cèl·lules endotelials per arribar a les cèl·lules diana, però també existeixen evidències que indiquen que les glicoproteïnes de l'embolcall del virus poden unir-se a diferents receptors de diversos tipus cel·lulars, determinant el tropisme i la susceptibilitat en l'entrada. Així doncs, l'inici de la infecció es donaria mitjançant la unió del virió amb els receptors de lectines tipus C (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*, -DC-SIGN- i *Liver/lymph node-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing integrin*, -L-SIGN-) expressats majoritàriament a les cèl·lules dendrítiques i a l'endoteli sinusoidal. Aquests s'ha vist que juguen un paper clau en l'establiment de la infecció, doncs mitjançant la unió específica amb E2 atrapen el virus de la circulació sanguínia i el transporten a través de l'endoteli sinusoidal cap a l'espai de Disse, posant en contacte el virió amb l'hepatòcit (200). Així doncs, existeixen receptors que no estan directament implicats en l'entrada però que la fan més eficient ja que capturen, concentren i faciliten l'apropament dels virions a les cèl·lules diana.

La interacció inicial del viriό amb la membrana cel·lular es donaria amb els glicosaminoglicans (GAGs)(201), el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (*Low Density Lipoproteins Receptor*, LDLr) (202) i possiblement altres proteïnes de la superfície cel·lular involucrades amb la unió i el metabolisme de lipoproteïnes del sèrum. Això permetria concentrar les partícules virals a la superfície de l'hepatòcit possibilitant, a continuació, la interacció específica i coordinada del virus amb el receptor SR-B1 (131), la tetraspanina CD81 (132) i les proteïnes de les unions estretes CLDN1 (194) i OCLN (195, 203).

Recentment s'han descrit dos receptors tirosina quinasa, EphA2 i EGFR que actuarien com a cofactors de l'entrada del virus, regulant les associacions entre CD81 i CLDN1 i la fusió de les glicoproteïnes de l'embolcall del virus amb la membrana plasmàtica (105). De la mateixa manera, Sainz *et al.* (106) han demostrat que el receptor NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like 1*), d'expressió als enteròcits intestinals i als hepatòcits i amb funció d'absorció de colesterol, és necessària per a la infecció del VHC, probablement, intervenint en la fusió de la membrana cel·lular i viral.

1.9.2.1 Glicosaminoglicans (GAGs)



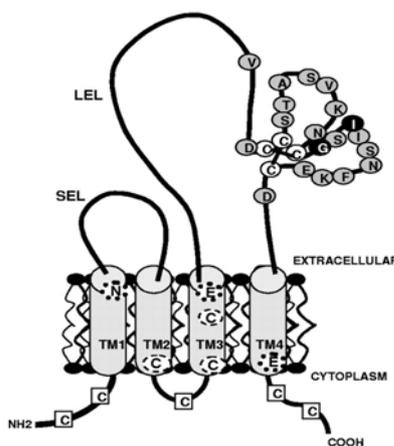
Els GAGs són polisacàrids lineals de superfície cel·lular que es troben al teixit connectiu, epitelial i ossi i que tenen la capacitat d'interactuar amb diferents virus. La unió amb el VHC es creu que està intervinguda per E2 i que succeeix preferentment amb GAGs altament sulfatats com ara l'heparan sulfat (HS) (201, 204), tot i que també s'ha descrit la interacció a través de les

lipoproteïnes apoE i apoB associades a l'embolcall del virus (205-207).

Com els GAGs s'expressen ubiquament, és poc probable que siguin receptors d'alta afinitat i especificitat, però poden jugar un paper important en la retenció temporal del viriό a la superfície cel·lular, facilitant la interacció amb receptors menys abundants però més afins al VHC.

el fetge, macròfags i al teixit esteroidegènic. Aquest receptor es situa principalment a la membrana basolateral dels hepatòcits (212) (**Figura 15**), recolzant la hipòtesi que el virus que arriba per la circulació sanguínia i interacciona amb molècules situades a aquest pol cel·lular (213). La unió del virió amb SR-B1 pot ser directa o indirecta, a través de les lipoproteïnes associades a l'embolcall de la partícula viral. El receptor SR-B1 pot unir diverses molècules, les quals tenen diferent impacte en la infectivitat del VHC: partícules LDL oxidades són capaces d'inhibir l'entrada, mentre que la molècula HDL, el lligand fisiològicament més important d'aquest receptor, és capaç d'augmentar-la quan s'administra durant la infecció (209, 214). El silenciament del receptor mitjançant ARN d'interferència o l'ús d'anticossos anti-SRB1 resulta en una inhibició de la infecció, tot i que no de forma completa i amb variacions entre els diferents genotipus virals (215, 216). Així mateix, la deleció de la RHV1 de la glicoproteïna E2, lloc d'unió al receptor SRB1, també provoca una disminució en l'entrada de les pseudopartícules (217, 218). L'administració en cultius cel·lulars del fàrmac BLT-4 (*blocker of Lipid Transfer*), que inhibeix l'entrada d'HDL tot i permetre la seva unió a SR-B1, no afecta els nivells d'infectivitat basal però sí aquells fruit de l'aport extra d'HDL (209, 214, 219). Això suggereix que SR-B1 probablement faciliti l'entrada del VHC mitjançant l'enriquiment de la membrana amb colesterol, tal com demostra l'estudi de Kapadia *et al.* (220). Es creu que la capacitat que té SR-B1 de modificar la composició lipídica de la membrana plasmàtica pot conduir a l'increment en l'entrada del virus dins la cèl·lula, facilitant així alguns esdeveniments primers del cicle de vida del VHC.

1.9.2.4 Cluster de Diferenciació 81 (CD81)

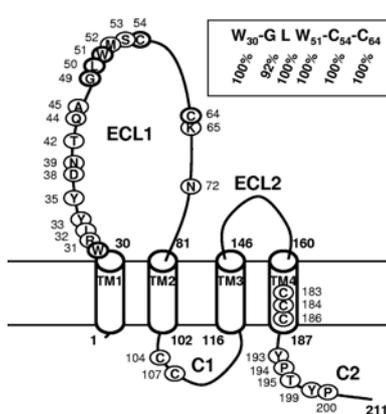


CD81 és una glicoproteïna que pertany a la família de les tetraspanines, la majoria de les quals són proteïnes de superfície cel·lular caracteritzades per la presència de quatre hèlix transmembrana separades per dos llaços extracel·lulars. El llaç extracel·lular llarg (LEL) conté les característiques estructurals que defineix les proteïnes d'aquesta família i formen, a la superfície cel·lular, el que

s'anomenen microdominis enriquits de tetraspanines (*tetraspanin enriched microdomains*, TEMS). CD81 influeix en l'adhesió, morfologia, activació, proliferació i diferenciació de les cèl·lules B i T, entre d'altres (221) i s'ha descrit la seva implicació en l'entrada als hepatòcits de *Plasmodium falciparum*, l'agent etiològic causant de malària (222). Aquest s'expressa ubiquament i es localitza a la membrana basolateral dels hepatòcits on colocalitza amb els receptors CLDN1 i SR-B1 (213) (**Figura 15**). El bloqueig, mitjançant anticossos, de la interacció E2-CD81(LEL) inhibeix la infecció de les HCVpp (167, 168, 215, 223), de les HCVcc (216) i de les partícules virals procedents del plasma de pacients infectats (224), de la mateixa manera que succeeix quan es disminueix l'expressió de CD81 mitjançant ARN d'interferència (225). Cocquerel *et al.* (226) van demostrar que l'heterodímer E1E2 estableix interaccions molt més fortes amb CD81 que sE2, suggerint que E1 pot modular la unió d'E2 amb el receptor. En cultius cel·lulars s'ha demostrat també que la línia HepG2, deficient en CD81 i per tant resistent a l'entrada del VHC, esdevé susceptible a la infecció quan se li expressa el receptor (225).

Finalment, diferents estudis demostren que CD81 activa la cascada de senyalització Raf/Mek/ERK, involucrada en passos posteriors a l'entrada del virus (227) i que és capaç de modular la resposta immunitària adaptativa a través de la interacció del virus amb les cèl·lules T i B, el que condueix a la persistència i a la patogènia viral (228).

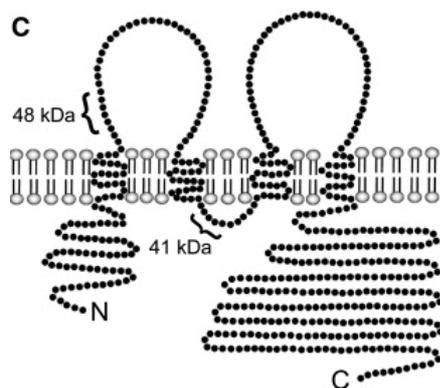
1.9.2.5 Claudina-1 (CLDN1)



Claudina-1 (22-27 kDa) és un dels 24 membres de la família de Claudines, les quals formen les TJ intercel·lulars. Les TJ rodegen l'extrem apical de la superfície lateral de les cèl·lules epitelials adjacents (**Figura 15**), fent de barrera física que controla el moviment de soluts a través de la ruta paracel·lular. Aquesta proteïna, d'expressió ubiqüa, està altament expressada en el fetge (229). Té quatre hèlixs transmembrana i dos llaços extracel·lulars, el primer dels quals s'ha descrit que és crític per a l'entrada del VHC. Anticossos dirigits contra un epítip d'aquest domini

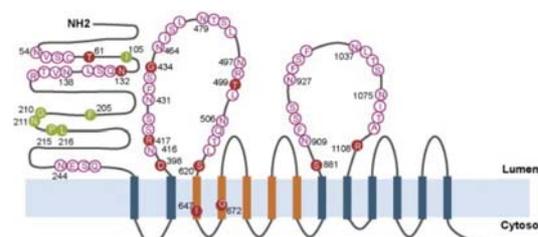
extracel·lular bloqueigen la infecció, i la cinètica d'aquesta inhibició indica que CLDN1 actua en els darrers passos del procés d'entrada, després de la unió del virus i la interacció amb SR-B1 i CD81 (194). Està descrit que les glicoproteïnes de l'embolcall del VHC no interaccionen directament amb CLDN1 sinó que és l'associació E2-CD81-CLDN1 la que possibilita l'entrada del virió (194, 230). CLDN1 es concentra predominantment al pol apical dels hepatòcits, tot i que també hi ha certa expressió a la membrana basolateral (165, 213, 231). És en aquesta darrera zona l'únic lloc on s'ha pogut detectar l'associació CD81-CLDN1, suggerint que només la CLDN1 que forma els contactes cèl·lula-cèl·lula (situada fora les TJ) intervé en el procés d'entrada (165, 195, 232, 233).

1.9.2.6 Ocludina (OCLN)



L'occludina (65 kDa) és una proteïna integral de membrana amb dos llaços extracel·lulars que, juntament amb CLDN1, formen el principal component de les TJ (**Figura 15**) amb la funció principal de mantenir la barrera hepato-biliar. En cèl·lules infectades pel VHC, Benedicto *et al.* (203) van demostrar que OCLN s'acumula al RE on colocalitza amb la glicoproteïna E2 del VHC, associació que va ser confirmada posteriorment per altres investigadors (195). Recentment també s'ha demostrat que l'expressió d'OCLN humana en cèl·lules murines les feia susceptibles a la infecció pel VHC (160). Aquests resultats suggereixen que OCLN interacciona directament amb E2, facilitant l'entrada del virus a través de les TJ, i que d'entre tots els factors d'entrada identificats, OCLN i CD81 són espècie-específics, determinant el tropisme del VHC pels hepatòcits humans (160). Aquest descobriment ha permès el desenvolupament d'un model de ratolí genèticament humanitzat per a l'estudi de l'entrada del VHC (85).

1.9.2.7 Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1)



NPC1L1 és una proteïna transmembrana que es troba a l'epiteli cel·lular del tracte gastrointestinal (234) i als hepatòcits, on

es localitza a la part apical (canalicle biliar) dels mateixos (**Figura 15**). La seva funció al fetge és la de reabsorvir el colesterol no esterificat secretat a la bilis quan el contingut cel·lular de colesterol és baix (235). Sainz *et al.* (106) han mostrat molt recentment que el silenciament d'NPCL1, l'ús d'inhibidors químics (ezetimibe) o d'anticossos contra el domini d'unió a colesterol de NPCL1 disminueixen la infecció d'VHCcc. Això suggereix que probablement aquest receptor actua de forma indirecta en l'entrada del virus modulant els nivells de colesterol. Donat que l'absorció de colesterol ha estat descrita mitjançant la cooperació entre SR-B1 i NPCL1, no es descarta la possibilitat que aquestes proteïnes puguin cooperar en l'entrada del VHC.

1.9.2.8 Receptor del Factor de Creixement Epidèrmic (EGFR) i Receptor 2 d'Epinefrines tipus A (EphA2)

Els receptors EGFR i EphA2 són proteïnes transmembrana de superfície cel·lular. La unió a lligands específics estimula l'activitat tirosina-quinasa i l'autofosforilació del domini intracel·lulars iniciant múltiples cascades de transducció de senyals. EGFR està involucrat en la regulació de processos relacionats amb la proliferació cel·lular, supervivència, diferenciació durant el desenvolupament, homeostasi dels teixits i tumorigènesi (236), mentre que EphA2 és responsable del posicionament, morfologia, polaritat i motilitat cel·lular (237). Lupberger *et al.* (105) han demostrat que els dos receptors tirosina-quinasa intervenen en l'entrada del VHC regulant les associacions CD81-CLDN1 i la fusió de les glicoproteïnes virals amb la membrana de la cèl·lula hoste. En el mateix estudi demostren també que el bloqueig de l'activitat quinasa mitjançant inhibidors actualment comercialitzats pel tractament del càncer (erlotinib i desatinib) tenen activitat antiviral tant *in vitro* com *in vivo*, i que l'ús d'anticossos monoclonals contra aquests receptors permet inhibir l'entrada del VHC (105). Aquests resultats posen de manifest el potencial terapèutic d'aquests receptors per prevenir i tractar la infecció pel VHC.

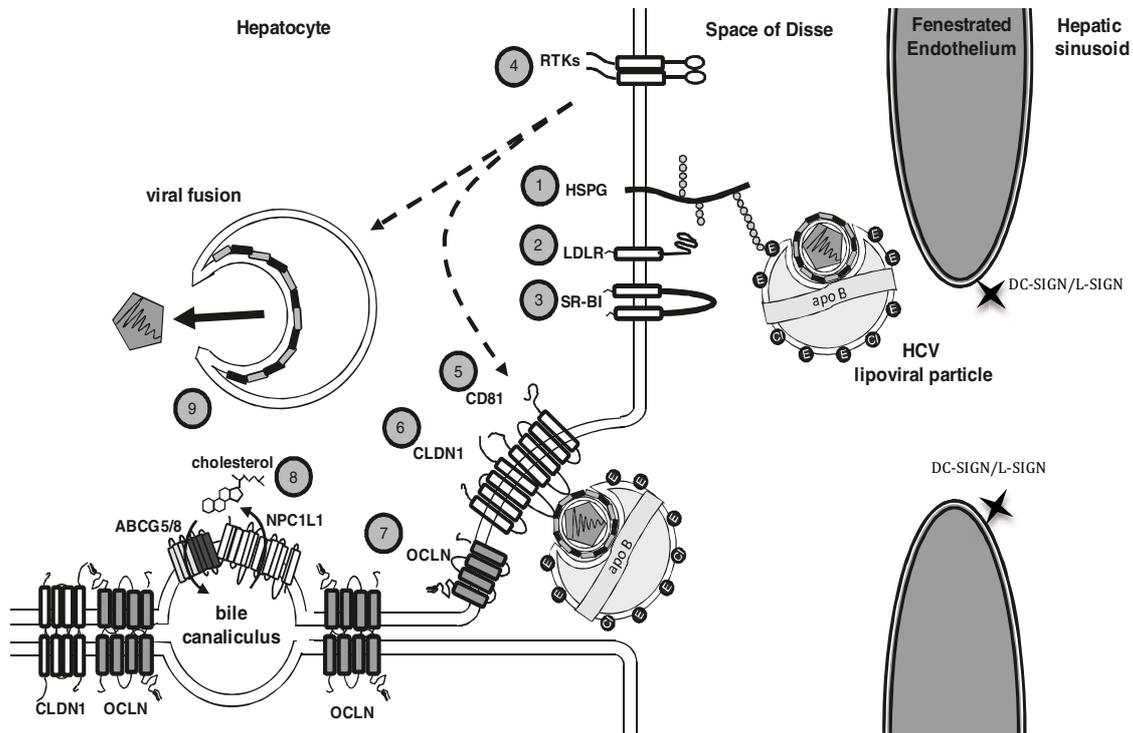


Figura 15. Entrada del VHC als hepatòcits. El VHC circula físicament associat majoritàriament a lipoproteïnes VLDL, les quals contenen components proteics com l'apolipoproteïna B-100, apoE i apoCI (cercles negres). El VHC accedeix als hepatòcits atravesant les fenestres existents entre les cèl·lules endotelials ja sigui lliurement o mitjançant la unió de les glicoproteïnes de l'embolcall a L-SIGN i DC-SIGN (estrelles negres). El primer pas d'entrada és la unió del viriò a través de les glicoproteïnes E1 i E2 (rectangles negres i grisos que envoltes la partícula viral) i/o apoE al proteoglicà heparan sulfat (HSPG) (1), d'apoE al receptor LDL (2) i d'E2 o diferents lipoproteïnes a SR-B1 (3). A més, SR-B1 també intervé en passos posteriors a la unió. Els receptors tirosina quinasa (RTK) EGFR i EphA2 (4) promourien el reordenament molecular a nivell de membrana plasmàtica que facilitaria l'associació entre CD81 (5) i el co-receptor CLDN1 (6), requerida per a la internalització del viriò. Així doncs, CD81, SR-B1 i CLDN1 actuarien molt estretament en el temps. El receptor OCLN, un altre component essencial de les TJ, contribuiria juntament amb CLDN1 al procés d'entrada (7) de la mateixa manera que NPC1L1 (8), receptor de localització canalicular involucrat en la reabsorció de colesterol de les secrecions biliars mitjançant la proteïna transportadora (ABC) G5/8. La fusió de la membrana del VHC amb la membrana cel·lular (9) seria el darrer pas del procés d'entrada. Zeisel *et al.* (238)

1.9.3 Replicació, assemblatge i alliberament

Després de l'endocitosi mediada per clatrina de la partícula viral i de la fusió pH dependent de l'embolcall del virus amb la membrana de l'endosoma, l'ARN del VHC és alliberat al citosol cel·lular (168, 239). La traducció de l'ARN té lloc al RE rugós, on mitjançant el reconeixement de la seqüència IRES per part del ribosoma es genera una poliproteïna que serà processada per proteases virals i de l'hoste

(veure apartat 1.7). L'expressió de les proteïnes virals provoca l'alteració de membranes cel·lulars, el que condueix a la formació de les *membranous web* (**Figura 16**). Aquest grup d'estructures de doble membrana, detectables per microscòpia electrònica, proporcionen un compartiment intern el qual permet que es concentrin les proteïnes virals i cel·lulars requerides per a la replicació del genoma i al seu torn n'impedeix la degradació per part de la cèl·lula hoste (240). La formació d'aquestes xarxes membranoses la duu a terme principalment la proteïna NS4B, tot i que hi ha estudis que demostren que NS5A i altres proteïnes no estructurals també hi estan involucrades (241). La replicació del genoma té lloc gràcies a la proteïna NS5B en col·laboració amb altres proteïnes no estructurals del virus i factors de l'hoste com ara la ciclofil·lina A (242), les proteïnes VAP-A i VAP-B (243) i MIR-122 (91). Utilitzant com a motlle la cadena d'ARN positiva es sintetitzen els intermediaris replicatius de polaritat negativa, els quals serviran per generar múltiples còpies de la nova progènie (**Figura 16**). La formació i l'assemblatge de les partícules virals infeccioses es creu que succeeix a la superfície de les gotes lipídiques (*Lipid Droplets*, LD) de la cèl·lula hoste, i tant l'assemblatge com l'alliberament dels virions estan estretament lligats a la ruta de secreció de les partícules VLDL (96).

1.9.3.1 Les *lipid droplets* i la replicació del VHC

Per a conservar els excessos d'esterols i d'àcids grassos, les cèl·lules utilitzen l'estratègia de transformar-los en lípids neutres i emmagatzemar-los en forma d'unes organel·les anomenades LD. Aquestes estan constituïdes per un nucli de lípids neutres (bàsicament triglicèrids i ésters de colesterol), envoltat d'una monocapa de fosfolípids amb proteïnes associades. Les LD s'expressen obliquament i la principal funció atribuïda és la de reserva de lípids (els quals poden ser utilitzats per al metabolisme, síntesi de membranes i d'esteroids, a més de formar part del mecanisme homeostàtic encarregat de regular els nivells intracel·lulars de colesterol). Estudis de proteòmica han identificat més d'un centenar de proteïnes associades a les LD que es poden agrupar en: 1. el grup de la família PAT, anomenat així pels primers membres que van ser identificats (perilipina, adipofilina -ADRP- i *tail-interacting protein of 47 kDa* -TIP47-); 2. el

grup format per enzims del metabolisme lipídic; 3. proteïnes involucrades en la regulació del trànsit intracel·lular (d'entre les quals destaquen les proteïnes Rab); 4. xaperones; 5. elements del citoesquelet; 6. proteïnes del RE i 7. proteïnes mitocondrials. Les LD són estructures molt dinàmiques que poden interaccionar entre elles o amb altres orgànuls cel·lulars, regulant múltiples funcions. Diversos estudis demostren que l'assemblatge de les partícules del VHC succeeix al voltant de les LD. Tot i que els detalls del procés no es coneixen amb exactitud, tots els estudis fets *in vitro* demostren que es requereix de l'acció coordinada de les glicoproteïnes E1-E2 residents al RE, el reclutament de les LD associades a core (145, 244-246) i diversos factors virals i de l'hoste. Diferents estudis en cultiu cel·lular demostren que la localització de NS5A és molt pròxima a les LD (145, 247), el que permet el contacte amb core i atura la replicació de l'ARN donant pas a l'assemblatge (142). La proteïna NS2 és un altre element fonamental en aquest procés ja que interacciona amb E1-E2, p7 i el complex enzimàtic NS3-4A, traslladant-los als llocs d'assemblatge pròxims a les LD. Diferents investigadors han demostrat, *in vitro*, que la interacció NS2-NS3-4A (248) i NS2-p7 (137, 249) és també essencial per reclutar el core de les LD als llocs propers on es dona l'assemblatge (**Figura 16**).

1.9.3.2 La via de secreció de partícules VLDL: assemblatge i alliberament del VHC

L'assemblatge i l'alliberament dels virions estan estretament lligats a la ruta de secreció de les partícules VLDL/LDL (96). Les partícules VLDL es fabriquen en els hepatòcits i són els precursors de les molècules LDL, encarregades del transport de lípids i colesterol a través de la circulació sanguínia.

La superfície d'aquestes partícules està associada amb ApoB i també s'associen transitòriament amb les apolipoproteïnes: ApoA, ApoC i ApoE. La biosíntesi de les VLDL es dona en dos passos: 1. les molècules ApoB de nova síntesi es transloquen al RE per formar els precursors VLDL. El correcte plegament d'ApoB requereix del transport co-translacional de lípids al RE mitjançant la proteïna MTP (250) i 2. El precursor VLDL pateix diferents passos de lipidació (adquirint lípids de les LD ja

sigui al lumen del RE o a l'aparell de golgi) i forma les partícules VLDL madures les quals seran secretades a través de l'aparell de golgi (251).

Diferents estudis demostren que l'assemblatge de VHCcc i VLDL estan estretament lligats: per un costat, l'adició al medi d'un inhibidor de la proteïna MTP és capaç de bloquejar la producció de partícules virals (96, 252). Per altra banda, les cèl·lules Huh7, en no produir autèntiques molècules VLDL (estan poc lipídades), secreten VHCcc de densitats superiors a les partícules produïdes en humans i ximpanzés, el que fa que siguin menys infeccioses (253, 254). Darrerament han sortit nous estudis que indiquen que és ApoE, i no ApoB, la proteïna essencial per a l'assemblatge del virió (255, 256). ApoE és un component de les partícules virals infeccioses i és capaç d'interaccionar amb NS5A, el que induiria l'esmentat procés (257).

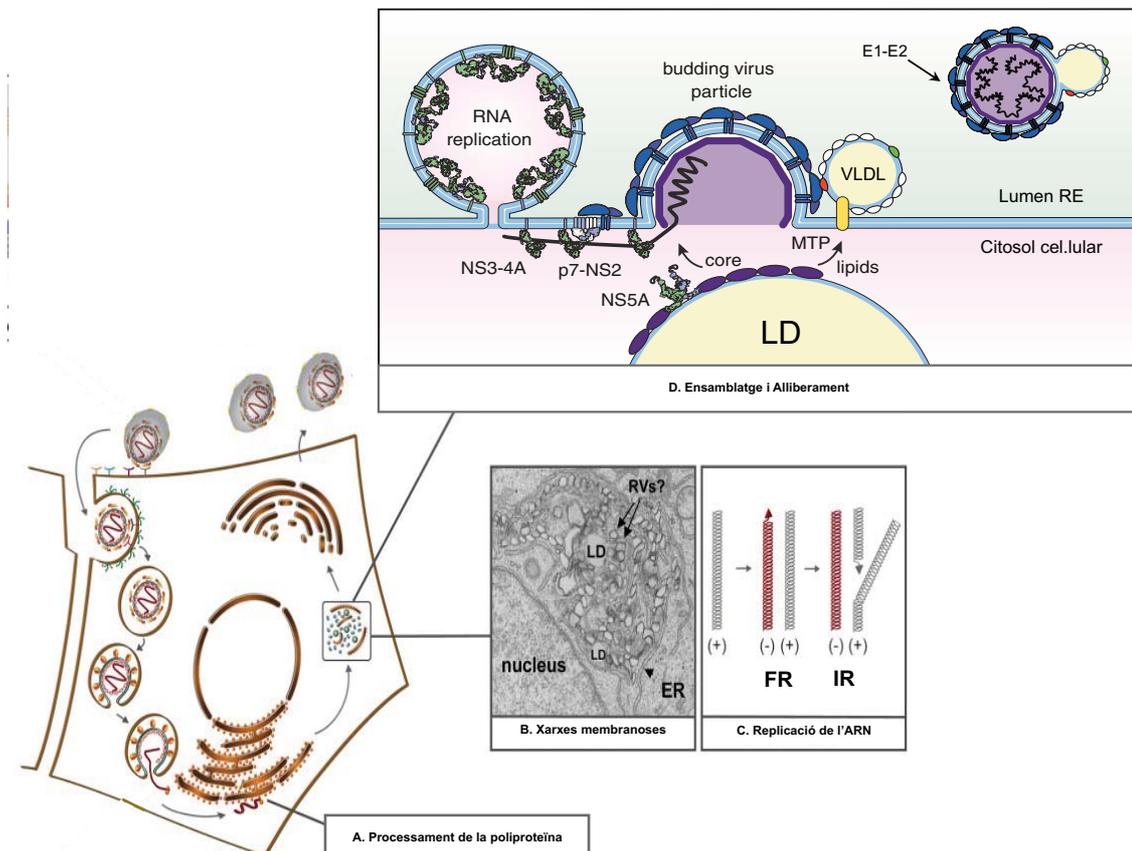


Figura 16: Replicació, assemblatge i alliberament del VHC. L'entrada del virus està mediada per clatrina i la fusió de la membrana endosomal i viral és un procés pH-dependent. L'ARN és alliberat al citoplasma, traduït i processat a les membranes del RE (A). La replicació de l'ARN té lloc a les xarxes membranoses (B). Durant la replicació de l'àcid nucleic es genera una doble cadena d'ARN, anomenada forma replicativa (FR), on hi ha l'intermediari replicatiu (IR) que s'utilitza com a motlle per sintetitzar la nova progenie (C). Les partícules virals s'ensamblen en zones properes al RE, a la superfície de les LDs. En cooperació amb la ruta de secreció de les partícules VLDL, els virions s'acaben de formar i són alliberats. Adaptat de Bartenschlager *et al.* (258)

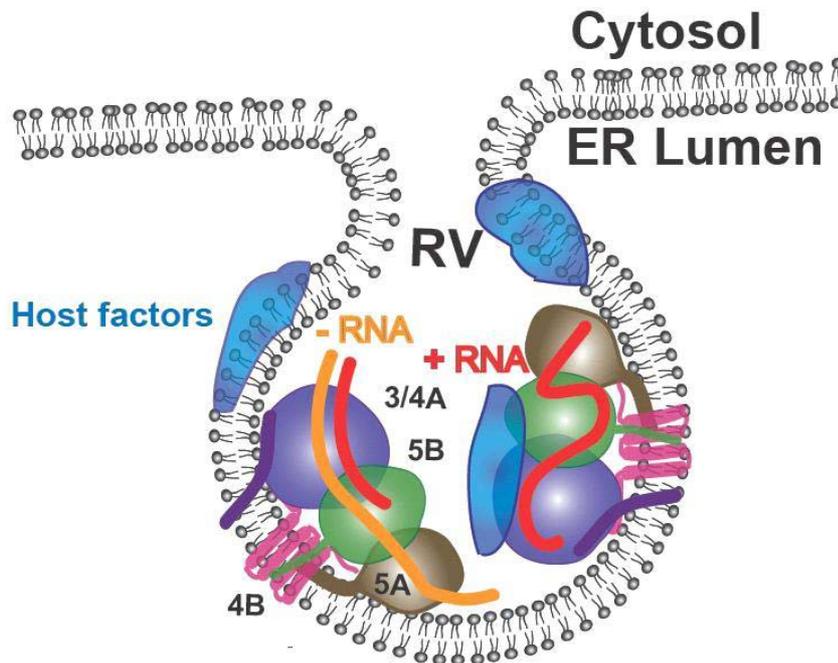
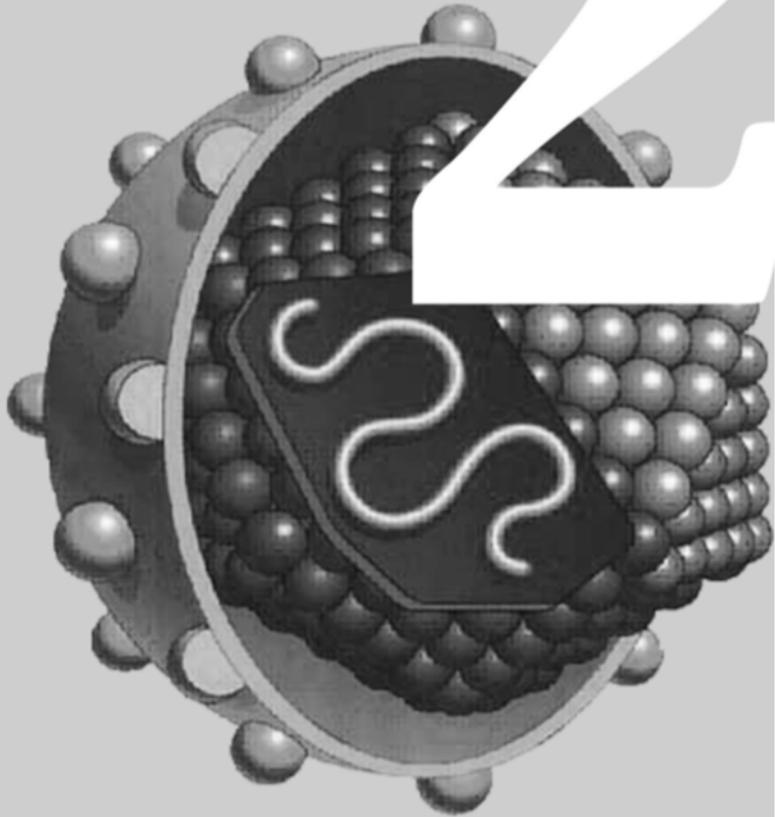


Figura 17: invaginació de la membrana del RE que permet la formació de vesícules de replicació (*Replication Vesicles, RV*). Factors virals i de l'hoste requerits per a la replicació de l'ARN viral es concentren dins d'aquestes estructures i formen el complex de replicació. En concret, consten de les proteïnes NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, l'ARN viral i factors cel·lulars addicionals (figura cedida pel Dr. Volker Lohmann)

2



HIPÒTESIS I OBJECTIUS

En una proporció significativa d'individus infectats pel VHC, la infecció crònica pot conduir a la cirrosi i al carcinoma hepatocel·lular, el que la converteix en la primera indicació de TH en els països desenvolupats. Desafortunadament, la infecció del nou empelt és universal en el moment de la reperfusió del fetge, i la progressió de la malaltia és més accelerada en els pacients immunodeprimits sotmesos a TH. L'absència d'un règim preventiu i la limitada eficàcia dels tractaments estàndards per combatre el virus és un inconvenient important per als pacients receptors d'un nou òrgan. Tot i que es coneixen alguns factors virològics i de l'hoste que condicionen el desenvolupament de la malaltia, poder identificar de forma precoç els malalts amb més risc de patir una forma greu d'hepatitis pot ser de gran ajuda per la presa de decisions terapèutiques. Tot i així, el diagnòstic de la recurrència de l'hepatitis C durant els primers mesos posteriors al TH, i en especial el diagnòstic histopatològic, no sempre és fàcil.

El procés d'entrada del virus juga un paper clau en el tropisme del VHC pels hepatòcits, el qual està definit per la interacció de la partícula viral amb un conjunt de factors de superfície de la cèl·lula diana. Els avanços tecnològics dels darrers temps, els quals han permès aprofundir en aquest fenomen, demostren l'elevat grau de complexitat i coordinació requerit entre el virus i determinats factors cel·lulars, la interacció dels quals provoca un reordenament molecular a nivell de membrana plasmàtica i, posteriorment, la internalització del viriò. Fins al dia d'avui no existeix cap estratègia per a prevenir la internalització del virus dins la cèl·lula, en part, perquè es desconeixen els mecanismes que hi estan implicats. Diferents estudis *in vitro* han analitzat el paper de la infecció pel VHC en la regulació dels receptors d'entrada, però s'han descrit resultats discrepants que posen de manifest certes limitacions degudes, probablement, als sistemes d'estudi emprats per a aquest fi (manca d'un model de cultiu cel·lular autènic que mimetizzi l'arquitectura, la polarització, la diferenciació dels hepatòcits i alhora, capaç de suportar el cicle viral sencer i manca de genomes complets de tots els genotipus del VHC capaços de reproduir el cicle de vida). De la mateixa manera, els esforços dirigits a la detecció de proteïnes virals o ARN en teixit hepàtic han esdevingut també un repte degut a la poca sensibilitat i especificitat de les tècniques actuals i a

l'heterogeneïtat de mostres emprades, el que ha generat resultats contradictoris i poc concloents.

L'entrada del virus a l'hepatòcit és necessària per a la iniciació, disseminació i perpetuació de la infecció i té un paper fonamental en la patogènesi de la malaltia. Com ja ha estat demostrat, l'entrada massiva de virus juntament amb la capacitat d'escapar del bloqueig provocat pels anticossos neutralitzants, determinen la selecció de variants virals des dels inicis del TH, el que pot contribuir a la severitat i a la persistència de la infecció. En aquest context, és interessant determinar els nivells d'expressió de receptors al moment del TH i estudiar la possible relació amb la cinètica viral precoç i la recurrència de la infecció. D'altra banda, el VHC infecta de forma predominant els hepatòcits, però es desconeix la proporció dels mateixos que el contenen. Tot i que s'ha suggerit que, pacients en fase crònica de la infecció tenen l'ARN-VHC virtualment present per tot el parènquima hepàtic, estudis recents mostren que la majoria dels hepatòcits no estan infectats i que els antígens del virus s'expressen en tan sols algunes cèl·lules distribuïdes de forma no aleatòria i localitzades en *clusters*. Aquest patró de distribució permet pensar que el VHC té un mecanisme de propagació cèl·lula-cèl·lula que l'ajuda a perpetuar-se escapant del control del sistema immunitari. És per això que la visualització d'antígens del virus mitjançant la detecció immunohistoquímica pot ser de gran utilitat per al diagnòstic i la presa de decisions terapèutiques associades als pacients amb recurrència de la infecció, i podria aportar informació rellevant referent al cicle de vida del VHC, a la resposta de l'hoste, així com la relació entre els llocs on es produeix la replicació i el dany hepàtic.

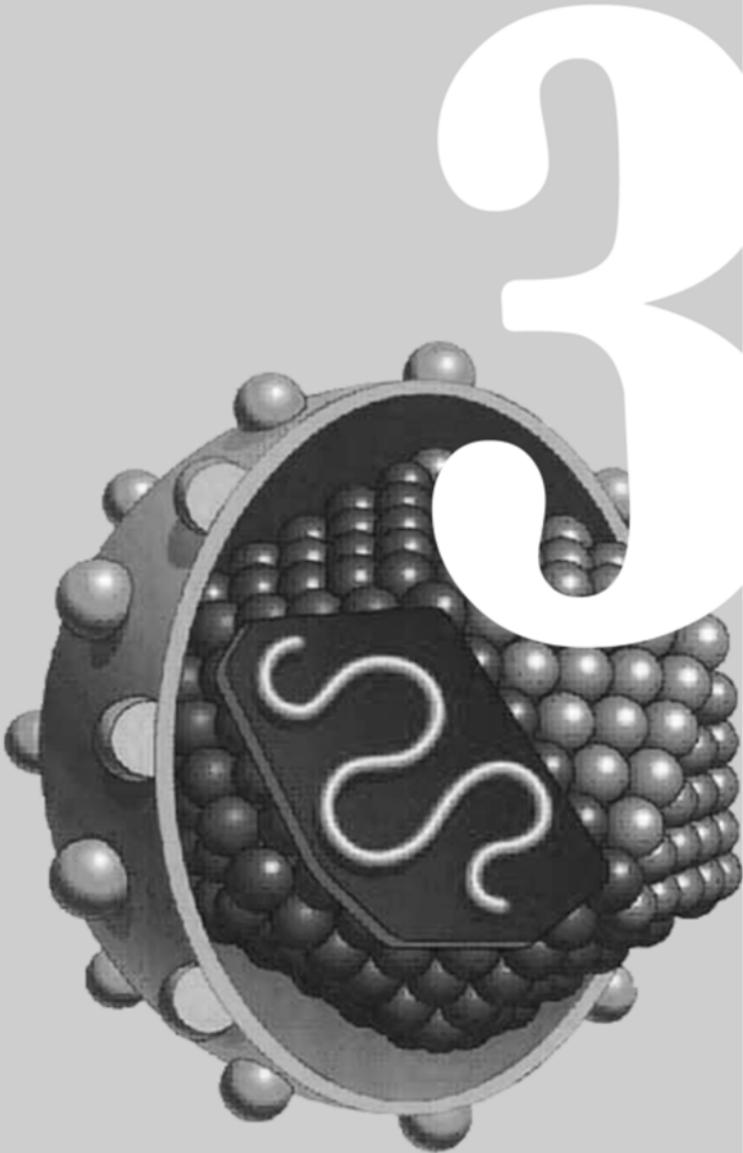
Per tot això, el TH és un molt bon model per a estudiar el comportament del virus i monitoritzar l'expressió i localització dels receptors implicats en la seva entrada. Donat que podem seguir la infecció de l'empelt des dels seus inicis i que, fruit dels tractaments d'immunossupressió, s'assoleixen elevats pics de càrrega viral durant els primers mesos després del TH (fase aguda de l'hepatitis), les probabilitats de detectar antígens del virus es veuen significativament incrementades. A més, la disponibilitat de biòpsies hepàtiques obtingudes a diferents moments temporals (indicades per protocol o per requeriments clínics) permeten fer un seguiment de

l'expressió dels receptors d'entrada i de l'evolució de la infecció abans i després del TH.

Aprofundir en el coneixement de les interaccions entre el virus i l'hepatòcit així com en la caracterització de l'expressió d'antígens *in vivo* esdevé una eina clau per a continuar avançant en la cerca de nous fàrmacs antivirals i en el desenvolupament d'una vacuna contra el VHC.

Així doncs, els treballs duts a terme en aquesta tesi, tenen com a objectiu:

1. Explorar *in vivo* amb mostres de fetge pre-TH i post-TH possibles canvis d'expressió/localització de determinats receptors involucrats en l'entrada del virus dins l'hepatòcit.
2. Analitzar si els nivells d'expressió de determinats receptors a l'empelt tenen alguna influència en la cinètica viral precoç i en la progressió de la malaltia.
3. Caracteritzar la presència d'antígens del VHC en biòpsies hepàtiques (mostres fixades en formol i incloses en parafina) procedents de pacients trasplantats amb recurrència de la infecció pel VHC.
4. Estudiar la possible associació entre l'expressió de proteïnes virals i paràmetres histopatològics (dany hepàtic i inflamació).



**RESUM DELS
ARTICLES**

3.1 Article 1: *Hepatitis C virus receptors claudin-1 and occludin after liver transplantation and influence on early viral kinetics.*

Per al primer treball de la tesi es van seleccionar 42 pacients sotmesos a TH entre el gener del 2000 i el gener del 2008 que patiren una recurrència de l'hepatitis C lleu (fibrosi inexistent -F0- o de grau lleu -F1- un any després del TH i gradient venós de pressió portal -GPP- normal) o greu (grau de fibrosi avançat $F \geq 3$ i/o GPP clínicament significatiu ≥ 10 mmHg- un any després del TH). S'inclogueren també 19 receptors d'un trasplant de fetge per altres causes i sense infecció per VHC.

S'obtingueren biòpsies hepàtiques en el moment de la reperfusió del nou òrgan, als 3 i als 12 mesos després del TH. Mitjançant tècniques d'immunofluorescència i microscòpia confocal, es caracteritzà i s'analitzà l'expressió dels receptors de les *tight junctions* CLDN1 i OCLN així com el receptor de membrana SR-B1. Per a la quantificació de l'expressió de cada receptor, i per tal que tota la biòpsia quedés ben representada, s'obtingueren 10 imatges de cada secció de fetge sobre les quals es va calcular la mitjana geomètrica de la suma d'intensitats de tots aquells voxels que superaven un llindar d'intensitat prèviament establert. La colocalització es calculà sobre reconstruccions en tres dimensions generades a partir d'imatges deconvolucionades adquirides en l'eix z de forma seqüencial, obtenint així el percentatge i la intensitat de colocalització de cada receptor. Paral·lelament s'analitzà l'expressió d'ARNm de CLDN1 i OCLN mitjançant PCR a temps real.

Per a l'estudi de la cinètica viral precoç s'obtingueren mostres de sèrum immediatament abans i després del TH, diàriament durant la primera setmana, setmanalment durant el primer mes i al mes 3, 6 i 12 després del TH. Es determinà la càrrega viral mitjançant PCR a temps real.

Els resultats obtinguts van ser els següents:

1. Localització dels receptors del VHC Claudina-1 i Ocludina als hepatòcits

L'expressió de les dues proteïnes de les *tight junctions* CLDN1 i OCLN es restringeix al pol apical de la membrana dels hepatòcits, tal com demostra la seva colocalització amb el marcador canalicular CD10 (clúster de diferenciació 10) i la deslocalització amb el receptor de membrana basolateral SR-B1.

En totes les mostres analitzades existeix un elevat grau de colocalització entre CLDN1 i OCLN (entre el 60% i el 94% del volum de CLDN1 colocalitza amb OCLN), tot i que els coeficients de correlació entre els voxels que colocalitzen varien de forma significativa entre pacients (de 0.2 a 0.86).

2. Cinètica viral i expressió de receptors.

La caiguda de la CV que succeeix a les primeres 24 hores just després del TH, la qual representa l'entrada massiva del virus en el nou òrgan, es correlaciona significativament amb els nivells del receptor SR-B1 que hi ha a l'empelt en el moment de la reperfusió ($r= 0.55$, $p= 0.007$). D'altra banda, l'increment de CV que té lloc durant la primera setmana després del TH, indicatiu de la replicació del virus en el nou òrgan, es relaciona significativament amb els nivells de CLDN1 i OCLN en el moment de la reperfusió ($r=0.63$, $p=0.005$).

3. Canvis en els nivells d'expressió i en el patró de distribució de CLDN1 i OCLN després de la infecció del nou òrgan.

El patró d'expressió de CLDN1 i OCLN roman constant en el temps i es restringeix al pol apical dels hepatòcits independentment del tipus de recurrència de l'hepatitis C.

S'observa un increment significatiu en els nivells de CLDN1 i OCLN 1 any després del TH ($p= 0.03$ i $p= 0.007$, respectivament) tant en pacients amb recurrència de la infecció lleu com greu. En els pacients controls, els nivells d'aquests receptors resten constants després del TH.

Els nivells de CLDN1 són superiors en els pacients amb recurrència greu de la malaltia (particularment als 12 mesos) tot i que les diferències no assoleixen valors estadísticament significatius.

En el subgrup de pacients amb hepatitis colestatàtica, els nivells de CLDN1 a l'any després del TH foren significativament majors que a la resta d'individus ($p= 0.005$), però no correlacionaren amb cap marcador bioquímic indicatiu de colèstasi o amb la CV obtinguda al mateix moment temporal.

3.2 Article 2: *Imaging of hepatitis C virus infection in liver grafts after liver transplantation.*

En el segon estudi d'aquesta tesi es van incloure 32 pacients sotmesos a TH entre l'any 2001 i 2010. Els criteris d'inclusió foren que es disposés de les biòpsies de reperfusió i de fase aguda de la infecció (on els nivells d'ARN-VHC en sèrum havien de ser igual o superiors als 6 Log₁₀UI/mL). En 23 d'aquests pacients s'obtingué, també, la biòpsia de seguiment. Com a controls negatius s'utilitzaren mostres de 10 pacients trasplantats per altres causes.

En totes les mostres s'analitzà l'expressió de l'antigen core mitjançant tècniques d'immunohistoquímica. S'adquiriren imatges representatives de tot el teixit sobre les quals dos observadors independents van fer el recompte manual de les cèl·lules core positives. Paral·lelament es va fer el doble marcatge de core-NS5A i NS5A-adipfil·lina, amb la finalitat d'analitzar la colocalització dels dos antígens virals així com la distribució relativa envers les *lipid droplets*. Per a aquest fi s'adquiriren imatges confocals, es deconvolucionaren i es reconstruïren cèl·lules individuals en 3D sobre les quals es calculà el percentatge i el grau de colocalització entre antígens.

Per a l'anàlisi histopatològica, les mostres es tenyiren amb les tincions utilitzades en la rutina de diagnòstic anatomopatològic: eosina-hematoxil·lina, reticulina i tricòmic de Masson. Les lesions histològiques s'analitzaren mitjançant la puntuació d'Ishak.

Els resultats obtinguts d'aquest estudi foren:

1. Característiques dels pacients

Un 97% i un 3% dels pacients estan infectats pel genotip 1 i 3 del VHC, respectivament. La mediana d'ARN-VHC en sèrum durant la fase aguda de la infecció és de 7.3 Log₁₀UI/ml. Un 78% dels pacients reben teràpia antiviral després del TH, d'entre els quals un 40% assoleix una resposta virològica sostinguda.

2. Diagnòstic histopatològic

Les biòpsies de reperfusió mostren danys lleus d'isquèmia/reperfusió. El diagnòstic principal de les biòpsies de fase aguda és el d'hepatitis aguda en un 81% dels casos, d'entre els quals un 31% presenta un patró d'hepatitis colestàtica. En el 19% de casos restants s'observen canvis mínims. Pel que fa a les biòpsies de seguiment, un 83% dels pacients presenta una hepatitis crònica, un 9% esteatosi, un 4% balonització focal i en el 4% restant no s'observen canvis histològics.

3. Detecció de la proteïna core en mostres de fetge fixades en formol i incloses en parafina

Totes les biòpsies de reperfusió, així com les mostres pertanyents als pacients trasplantats per altres causes diferents al VHC, donen negatiu per a la detecció immunohistoquímica de l'antigen core. Un 75% de les biòpsies de fase aguda són positives per a la detecció de l'antigen core, amb una mediana del percentatge de positivitat del 26% (rang 1-79). En tots els casos l'expressió està limitada únicament als hepatòcits, i el marcatge és citoplasmàtic, granular i amb diferents graus d'intensitat. En general, el patró de distribució de la tinció és difús, amb certa tendència a concentrar-se a les zones periportals. En aquells casos on hi ha un elevat nombre de cèl·lules infectades s'observen agrupacions d'hepatòcits core positius amb presència d'estructures circulars de diferents diàmetres localitzades al pol sinusoidal de la cèl·lula, fet que suggereix la localització de core al voltant de les *lipid droplets*.

No es va detectar expressió immunohistoquímica de l'antigen core en cap de les biòpsies de reperfusió ni tampoc en les mostres pertanyents a pacients trasplantats per altres causes diferents al VHC.

Totes les mostres de seguiment dels pacients que han fet una RVS són negatives per al core, i només 4 de 12 biòpsies (33%) pertanyents a pacients amb infecció crònica i ARN-VHC detectable en sang mostren expressió immunohistoquímica per a l'antigen. En aquests casos la mediana del percentatge de positivitat és menor que en les biòpsies de fase aguda (17% vs. 26% respectivament). Resultats molt similars s'obtenen amb mostres de pacients TH procedents d'un altre centre hospitalari.

Adicionalment, cal esmentar que totes les biòpsies positives per a core són positives per a NS5A i exhibeixen un patró de tinció similar.

4. Relació entre la tinció de l'antigen core i les característiques clíniques i histològiques

Existeix una correlació significativa entre el percentatge de cèl·lules core positives i: 1). l'activitat inflamatòria en el lobulec ($r= 0.51$, $p= 0.003$) i 2). els nivells d'AST ($r= 0.63$, $p=0.000$) i ALT ($r= 0.39$, $p= 0.029$). Hi ha una associació significativa entre la CV i la detecció de l'expressió de l'antigen core ($p= 0.004$), essent aquesta última del 100% en totes les biòpsies amb CV major a $8 \text{ Log}_{10}\text{UI/mL}$, del 68% en pacients amb CV compresa entre 6 i $8 \text{ Log}_{10}\text{UI/mL}$ i només del 14% en pacients amb CV per sota als $6 \text{ Log}_{10}\text{UI/mL}$. Tots els individus que desenvolupen una hepatitis colestatàtica després del TH són positius per a l'antigen core, el qual només es detecta en un 56% dels casos amb hepatitis aguda/lobel·lar no colestatàtica.

5. Colocalització de les proteïnes virals

El doble marcatge de core i NS5A s'ha dut a terme per a confirmar l'especificitat de la immunohistoquímica i per a investigar la distribució relativa de les dues proteïnes dins el citoplasma cel·lular. En 8 mostres de fase aguda on prèviament s'ha demostrat l'elevat percentatge de cèl·lules positives per a core, s'han seleccionat hepatòcits individuals i s'ha calculat el grau de colocalització entre els dos antígens: un 55% de la proteïna core colocalitza amb NS5A i un 66% de la proteïna NS5A colocalitza amb core. Aquesta colocalització es dona en forma d'estructures circulars en les quals NS5A es situa a la part més perifèrica. L'elevat percentatge de colocalització d'NS5A amb adipofil·lina (36%) demostra la proximitat dels dos antígens virals amb les *lipid droplets*.



DISCUSSIÓ

El VHC és un problema sanitari a escala mundial i en els països desenvolupats esdevé la primera indicació de TH. La recurrència de la infecció pel VHC és universal en pacients amb CV detectable en el moment del TH (259) i succeeix aproximadament en el 30% d'individus que van respondre al tractament antiviral i que van donar negatiu per a l'ARN-VHC en el moment del TH. La recurrència en aquests casos sembla ser que està relacionada amb la persistència de partícules virals en sèrum no detectades amb les tècniques actuals, a la mobilització de virus presents en el fetge durant el TH o a la presència de VHC en compartiments extrahepàtics com per exemple les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (197, 260) o les cèl·lules d'origen neuronal (261).

La resposta cel·lular innata i adaptativa tenen un paper fonamental en el control de la replicació del virus, però en la majoria de casos la fase aguda de la malaltia passa desapercebuda i un 75%-80% dels individus acaben desenvolupant una infecció persistent que condueix a danys irreversibles i que culmina en el desenvolupament de fibrosi, cirrosi i en alguns casos, de carcinoma hepatocel·lular. Un diagnòstic histològic acurat de la recurrència de la infecció esdevé fonamental per a iniciar la teràpia antiviral de forma precoç i evitar la progressió de la malaltia i la pèrdua de l'empelt, el que fa que la detecció d'antígens del virus en teixit prengui especial rellevància tant per a propòsits diagnòstics com per a entendre millor el cicle de vida del VHC i aprofundir en els mecanismes subjacents al dany hepàtic.

Es coneix poc en referència a la patogènesi del VHC, tot i que s'han postulat dos models paral·lels però no excloents que l'intenten explicar: 1. el model "immunopatogènic," el qual proposa que la persistència viral és fruit de la incapacitat immunològica de l'individu d'eliminar completament el virus i la lesió histològica, conseqüència de la resposta immune de l'hoste i 2. el model "citopàtic", que suggereix que la replicació del VHC i l'expressió de proteïnes virals són les responsables d'induir el dany hepàtic. Actualment no hi ha cap vacuna disponible per a combatre el virus i el tractament amb IFN-PEG/RBV en combinació amb inhibidors de la proteasa (Telaprevir o Boceprevir) no és efectiu en tots els casos i té efectes adversos molt greus. La necessitat urgent de desenvolupar noves

teràpies antivirals més efectives ha fet créixer, darrerament, aquelles basades en inhibidors de l'ARN polimerasa (Sofosbuvir) i la NS5A (Daclatasvir), però tenint en compte que l'entrada del VHC és el primer pas indispensable per a iniciar la replicació i que hi estan involucrades múltiples molècules, aquest procés esdevé també un blanc idoni molt interessant per a la intervenció antiviral.

Diferents estudis *in vitro* han permès avançar en el coneixement dels primers passos involucrats en l'entrada del VHC, posant de manifest l'existència de determinats receptors cel·lulars i l'elevat grau de coordinació existent entre ells. De totes maneres, qualsevol resultat procedent d'aquest tipus d'estudis necessita ser rigorosament testat en models animals el més propers a la realitat possible i, desafortunadament, els únics que existeixen i són capaços de suportar la replicació del VHC són el ximpanzé i els ratolins immunodeprimits uPA-SCID. Com l'ús dels primers és limitat per raons ètiques, tècniques i econòmiques i en els dos casos els resultats obtinguts en altres espècies animals no poden ésser traslladats de forma fidedigna als humans, el model del trasplantament hepàtic esdevé extremadament útil ja que podem monitoritzar la malaltia des dels seus inicis, es poden obtenir mostres de teixit hepàtic i sèrum abans i després de la infecció, i disposem de moltes dades que caracteritzen els pacients i l'evolució clínica de la malaltia.

Fins a data d'avui, l'expressió de receptors d'entrada del VHC no ha estat caracteritzada en el model del TH i no existeixen treballs que avaluin de forma consistent l'expressió d'antígens en les diferents fases de la infecció. És per això que el repte d'aquesta tesi ha estat el d'aprofundir en aquests dos aspectes amb la finalitat de relacionar-ho amb diferents formes de progressió de la malaltia i els mecanismes de patogeneïtat del VHC.

Durant el TH i a les poques hores després del mateix els nivells d'ARN del VHC en sang disminueixen ràpidament, el que indica que el nou òrgan és reinfectat pel virus circulant. Existeix molta variabilitat entre pacients pel que fa als valors de CV poques hores després de la reperfusió, el que ha estat relacionat, entre d'altres, amb: 1. la capacitat diferencial dels hepatòcits per unir i internalitzar el virus de forma més o menys eficient i 2. els danys d'isquèmia/reperfusió, associats al dany

dels receptors de superfície cel·lular i, en conseqüència, a la dificultat d'interacció del virus amb l'hepatòcit. Així mateix, a nivell d'expressió de proteïnes virals en teixit també existeixen moltes diferències entre individus, el que fa pensar que a banda de l'habilitat del virus per disseminar-se pel nou òrgan existeixin habilitats inherents a l'empelt que permeten iniciar i suportar la infecció amb més o menys èxit. Un exemple d'això el tenim amb els resultats obtinguts per Flint i col·laboradors (171) els quals conclouen que la quantitat de CD81 existent a la superfície cel·lular determina la quantitat d'E2 que pot unir-se a la cèl·lula, i Koutsoudakis *et al.* (262) que postulen que les cèl·lules necessiten una quantitat determinada d'aquest receptor per a què la infecció viral sigui productiva. Per analogia, els fetges que internalitzen més ràpidament els virus circulants durant el moment de la reperfusió probablement tinguin una densitat de receptors més elevada per a poder-ho fer, el que permetria accelerar l'entrada del VHC i evadir l'efecte dels anticossos neutralitzants del sistema immunitari. És per això que un dels objectius d'aquest treball va ser el d'estudiar el nivell d'expressió i el patró de localització dels receptors d'entrada del VHC en mostres de pacients sotmesos a un trasplantament i adquirides a diferents moments temporals (abans i després de la infecció). Es va fer especial èmfasi en les proteïnes de les TJ, estructures on es duu a terme la internalització de la partícula viral i que són clau per al manteniment de la polaritat cel·lular i el correcte funcionament del fetge. La seva pèrdua provoca els desordres associats a la colèstasi, en els quals les TJ que segellen el canalicle biliar perden la seva funció permetent l'intercanvi de proteïnes i àcids biliars entre el compartiment apical i basolateral (263). Existeixen diversos treballs *in vitro* que analitzen l'efecte del VHC en molècules que constitueixen aquest tipus d'unions: a l'estudi de Mee *et al.* (264) determinen que la infecció pel VHC altera la integritat de les TJ i promou la despolarització cel·lular, el que provoca un augment en l'entrada del virus. Així mateix, Benedicto *et al.* (265) demostren que quan les cèl·lules Huh7 contenen el replicó genòmic (però no el subgenòmic) desapareix la localització habitual de les proteïnes CLDN-1, OCLN i Zonula Occludens (ZO-1) i es dona la retenció d'OCLN al citoplasma cel·lular (a prop del RE). El trencament de les TJ l'atribueixen a les proteïnes estructurals core, E1 i E2 i creuen que podria suposar un avantatge pel VHC ja que n'afavoreix la seva entrada (consistent amb l'increment en l'accessibilitat als receptors després del trencament de les TJ).

Contràriament a aquests estudis, Yang *et al.* (232) demostren que només l'elevada expressió de CLDN1 a les zones on hi ha el contacte cèl·lula-cèl·lula promou l'entrada del VHC, el que concorda amb el treball d'altres grups que observen que certes mutacions que provoquen la deslocalització d'aquest receptor fora de les TJ impedeixen l'entrada del virus (195, 233).

En el nostre estudi no observem en cap cas retenció citoplasmàtica dels receptors, i les dues proteïnes de TJ analitzades abans i després de la infecció de l'empelt resten inalterables al pol apical de la cèl·lula inclús en els casos on es diagnosticà una hepatitis colèstica i en els que només s'observà una lleugera dilatació del canalicle biliar. Tenint en compte que algunes de les mostres analitzades en el primer treball serviren també per a la detecció d'antígens del virus i que mostraren un elevat percentatge de cèl·lules core positives, podem descartar la hipòtesi inicialment proposada en què possiblement la proporció d'hepatòcits infectada era petita i, degut a això, no podíem detectar els canvis morfològics associats a la colèstasi. Una explicació alternativa podria ser que tot i les manifestacions bioquímiques de colèstasi encara no existeixin alteracions morfo-histològiques que la facin evident, almenys a nivell de les TJ. El fet de no haver realitzat cap estudi dirigit específicament a valorar la funcionalitat d'aquestes estructures no permet concloure de forma sòlida que la pèrdua de funció equival a la pèrdua d'estructura. D'altra banda, l'anàlisi d'un elevat nombre de camps per biòpsia (on quedaven representades més de 3000 cèl·lules per pacient), la verificació dels resultats mitjançant l'ús de diversos anticossos dirigits contra diferents epítops de les proteïnes d'estudi (dades no mostrades) i les manifestacions clíniques de colèstasi ens permeten confiar en la solidesa dels nostres resultats tot i la poca concordança amb els estudis *in vitro*.

Tot i l'absència de canvis estructurals a nivell de les TJ, en els pacients infectats pel VHC si que s'observà un increment d'expressió de CLDN1 i OCLN al llarg del temps el qual fou particularment significatiu en individus amb colèstasi. Existeixen molts treballs que parlen de la transmissió directa cèl·lula a cèl·lula com un mecanisme del virus per escapar del sistema immunitari i maximitzar així la disseminació de la partícula viral (101, 266-268). L'augment d'aquestes dues proteïnes observat a

nivell de membrana apical ens va portar a pensar que podia afavorir aquest mecanisme, però en la detecció de la proteïna core que es va fer posteriorment, en pocs casos (tan sols en aquells pacients amb una CV $>10^8$ UI/mL) s'observaren els focus d'infecció o *clusters* descrits com a suggerents de la transmissió cèl·lula a cèl·lula. El patró de distribució de core en la majoria d'individus es caracteritzava per ser el de cèl·lules individualitzades repartides aleatòriament per tot el parènquima hepàtic, tot i que no podem descartar la possibilitat que existeixi una baixa expressió de la proteïna que s'escapa dels límits de detecció de la tècnica i/o que el mètode de recuperació d'antigen emprat no sigui l'òptim (i que per tant no estiguem visualitzant tot el core que realment s'expressa). Només en aquells casos en què existia un elevat nombre de cèl·lules core positives s'identificaven petits *clusters*, probablement degut a l'elevat percentatge de positivitat (al voltant del 79%) més que al mecanisme de transmissió via TJ *per se*.

Tot i que alguns autors postulen que la disseminació del virus es produeix en forma de focus, implicant un nombre limitat de cèl·lules en les que el VHC passaria d'una a l'altre a través de les TJ, els nostres resultats suggereixen que la principal via de transmissió és a través dels sinusoids (tot i que no descartem el mecanisme cèl·lula a cèl·lula). Aquestes discrepàncies podrien ser explicades, en part, per l'ús de diferents sistemes de microscòpia (un fotó vs. dos fotons (266)) i programes d'anàlisi d'imatges (266, 269, 270) emprats per caracteritzar l'expressió dels antígens virals. És per aquest motiu que actualment estem millorant aquest aspecte, fent ús d'un sistema de captació multiespectral capaç de treballar en l'espectre del visible i d'un software més avançat amb potents algorismes de separació i anàlisi que permet la caracterització i la quantificació de cada un dels components marcats en una imatge (271). D'altra banda tampoc podem descartar que l'increment de CLDN1 que observem en aquests pacients es degui a formes no funcionals de la proteïna, incapacitant-la per dur a terme la seva funció i afectant, de retruc, l'esmentada via de transmissió.

Així doncs, i contràriament a l'estudi de Liu *et al.* (195) en el qual atribueixen a les proteïnes estructurals del VHC la disminució de l'expressió de CLDN1 i OCLN i ho justifiquen dient que aquest seria un mecanisme que tindria el virus per a prevenir

la superinfecció (un estat en què les cèl·lules infectades esdevenen resistents a futures infeccions i que permet a la cèl·lula hoste contenir el virus), els nostres resultats estan d'acord, en part, amb l'estudi realitzat per Reynolds *et al.* (213) on demostren que els nivells d'expressió de CLDN1 es veuen incrementats en cèl·lules Huh7.5 infectades amb JFH1. Aquests canvis també els observen en mostres de teixit de pacients infectats pel VHC, tot i que aquest augment de CLDN1 va associat a l'expressió de la proteïna a nivell de membrana basolateral. Les discrepàncies existents entre els nostres resultats (augment proteic a nivell apical) i els obtinguts per Reynolds *et al.* (213) (augment proteic a nivell de membrana basolateral) podrien deure's a la diferent metodologia emprada (mentre ells valoren l'expressió immunohistoquímica de forma semiquantitativa en una escala que va de 0 a +++, nosaltres fem ús del programa IMARIS que permet la quantificació de la intensitat de la tinció de forma precisa i reproducible) i a la població de pacients analitzada (ells usaren fetges cirròtics).

Per a l'estudi de la cinètica viral precoç es quantificà diàriament durant la primera setmana la CV en sang. Estudis previs realitzats pel nostre grup ja han demostrat que durant la fase anhepàtica es produeix una ràpida disminució de l'ARN-VHC degut, en part, a la falta de producció de virions. Un cop es fa la reperfusió del nou fetge, la caiguda de la CV és encara més pronunciada, probablement degut a l'entrada massiva de virus a l'empelt. Dotze hores posteriors al TH es produeix un ràpid augment dels nivells d'ARN-VHC en sang, el que suggereix que la replicació viral és efectiva i que la infecció productiva del nou òrgan es dona de forma precoç. L'increment de CV pot arribar a ser fins a 20 cops superior als valors del preTH (47, 49, 272) donat que el nou òrgan és capaç de suportar millor la replicació que el fetge cirròtic (50) i també per l'efecte dels tractaments immunosupressors administrats per evitar el rebuig. Els nivells de CV abans del TH, que són bons predictors de la gravetat de la recurrència de la malaltia (273), assoleixen els seus màxims aproximadament un mes després del TH.

SR-B1 és un receptor de molècules HDL i VLDL que està altament expressat a la membrana basolateral del fetge. Aquest és capaç d'interaccionar amb la partícula viral a través de les lipoproteïnes que hi estan associades o mitjançant la interacció

amb E2 (131). La seva implicació en l'entrada es dona a diversos nivells: en primer lloc, durant fases molt primerenques, on la interacció entre el virus i el receptor té lloc a través de les apolipoproteïnes de la superfície del viriò. I en segon lloc, en fases més tardanes, on SR-B1 interacciona amb la RHV1 d'E2 determinant la velocitat d'entrada en funció de l'habilitat amb què el receptor s'uneix a la proteïna (274, 275). Donada la primera unió del virus amb SR-B1, té lloc la interacció del virus amb el receptor CD81, el qual migra per la membrana basolateral fins a contactar amb CLDN1. És a les TJ on CLDN1 i OCLN s'encarreguen de la internalització de la partícula viral. Donat que SRB1 és el primer receptor que contacta amb el virus i que diversos estudis *in vitro* demostren que l'augment o la disminució de la seva expressió estan directament relacionats amb l'increment o la reducció de la infectivitat de VHCcc i VHCpp (216, 276), i que CLDN1 i OCLN actuen en els darrers passos involucrats en l'entrada, afectant també la velocitat de propagació del VHC (101, 195, 265), vàrem decidir explorar si els nivells d'expressió d'aquests receptors en el moment del TH tenien alguna influència en la cinètica viral precoç, concretament, en la caiguda de la CV immediatament després de la reperfusió de l'empelt i en l'augment que té lloc posteriorment, una setmana després del TH. En aquest escenari els resultats mostraren que tot i que els nivells d'expressió d'SRB1, CLDN1 i OCLN no s'associaren amb la gravetat de la recurrència de l'hepatitis C post-TH, si que hi hagué una relació estadísticament significativa entre l'expressió de receptors a l'empelt en el moment del TH i la cinètica viral precoç. Existia una correlació significativa entre els nivells d'expressió d'SRB1 a l'empelt i la caiguda de la CV durant les primeres 24 hores posteriors al TH, el que estaria d'acord amb l'entrada massiva del VHC en el fetge immediatament després de la reperfusió del nou òrgan. Tot i així no podem ignorar l'existència d'altres variables que podrien estar influïent en aquest context, com ara la quantitat de sang perduda durant el procediment quirúrgic i els requeriments de sang transfosa que se n'associen i que contribueixen indubtablement a la disminució de la CV (47, 272). L'increment de CV que es donà durant la primera setmana després del TH va ser significativament major en aquells pacients que tenien més expressió de CLDN1 i OCLN. De nou, el sentit biològic d'aquests resultats podria ser que l'augment d'expressió d'aquests receptors faciliti la transmissió directe cèl·lula a cèl·lula, agilitzant així la

disseminació del virus pel fetge que, al seu torn, conduiria a l'increment en sang de les concentracions d'ARN del VHC. Tot i així és possible que altres variables que no s'han contemplat en aquest estudi (com per exemple: l'evolució de les quasiespècies, la capacitat del virus per replicar-se, etc) tinguin un paper important en la cinètica viral precoç i determinin també els resultats obtinguts. Més enllà de la primera setmana, els valors de CV augmentaren progressivament fins a assolir nivells màxims durant la fase aguda de la infecció (entre el primer i el sisè mes després del TH), el que és indicatiu de la replicació activa del virus i que ens va portar a estudiar la seva distribució en teixit. Tot i que existeixen molts estudis al respecte, els resultats obtinguts són molt discrepants i inconsistents (266, 269, 270, 277-286).

Amb l'objectiu de caracteritzar, doncs, la infecció des dels seus inicis i al llarg del temps, la selecció de pacients es va fer en base a la disponibilitat de les mostres de reperfusió (les quals serviren de control negatiu ja que en aquest punt encara no s'ha iniciat la replicació viral) i de fase aguda (en les que, amb la finalitat d'incrementar la probabilitat de detectar antígens del VHC, es fixà arbitràriament que els valors de CV en sang havien de ser igual o superiors a 10^6 UI/mL). En aquest punt, els valors d'ARN-VHC en sang s'associaven significativament amb el percentatge d'hepatòcits core positius, sobretot en aquells individus amb els nivells de CV més elevats (que coincidia, generalment, amb pacients amb colèstasi). Tot i així, l'associació no era molt forta probablement degut al fet que la CV en sang no té perquè coincidir amb els nivells de CV en teixit (287) o amb la quantitat de proteïna del virus que s'hi expressa (284, 285). Tenint en compte que el virus circula com una quasiespècie on no tots els virions tenen la mateixa capacitat d'infecció (288) i que només les partícules intrahepàtiques i associades a la membrana dels hepatòcits són les responsables del dany hepàtic (motiu pel qual valors de CV en teixit reflecteixin millor la magnitud de la malaltia), la mala integritat de l'ARN inherent a les mostres parafinades ha impedit quantificar la concentració del VHC en el fetge i poder orientar l'anàlisi en aquesta direcció.

En el 75% de les mostres de fase aguda en què fou possible detectar antígens del virus, la mediana del percentatge de cèl·lules core positives era del 26% (rang 1-

79). La intensitat del marcatge mostrava molta variabilitat, amb algunes cèl·lules molt positives per a la proteïna de la càpside i d'altres amb tinció més tènue. En les biòpsies de seguiment, on només detectarem el virus en un 33% dels casos, el percentatge de positivitat disminueix notablement del 26% al 17%. Tots els pacients que feren una RVS i totes les mostres de reperfusió donaren negatiu per a la detecció immunohistoquímica del virus, el que demostra l'especificitat de la tècnica emprada. El motiu pel qual només vam detectar antígens del VHC en un terç de les mostres de seguiment no és del tot clar. Per un costat existeix la possibilitat que el virus hagi tingut temps suficient per disseminar-se per tot el teixit i en conseqüència hi hagi una disminució de la concentració d'antígens virals per cèl·lula. Alternativament, i tal com s'ha descrit pel VHB, també seria possible que les cèl·lules amb el citoplasma positiu per al core estiguin en un estadi molt primerenc de la replicació del virus i, conseqüentment, encara no hagin desenvolupat determinants virals que les facin susceptibles al reconeixement pel sistema immunitari encarregat de la seva destrucció (289). Cal afegir que durant la fase crònica de la malaltia els pacients tenen valors de CV menors que els que s'assoleixen durant la fase aguda, el que pot dificultar la detecció d'antígens donats els límits de sensibilitat de la tècnica. Tal com observem en el nostre treball, existeix una clara relació entre la CV i la detecció del core, essent aquesta del 100% quan les mostres tenen una CV superior a $8 \log_{10} \text{UI/mL}$, del 68% quan la CV es mou entre 6 i $8 \log_{10} \text{UI/mL}$ i del 14% en aquells casos en que els nivells d'ARN-VHC són inferiors a $6 \log_{10} \text{UI/mL}$ (resultats que varen ésser confirmats amb una cohort de validació consistent en 11 pacients procedents d'un altre centre hospitalari). Existia també una correlació significativa entre el percentatge d'hepatòcits core positius i: 1. l'activitat inflamatòria al lobulete i 2. els nivells de les transaminases AST i ALT, el que ens suggereix que el dany hepàtic en aquest estadi de la infecció pot ser conseqüència tant del virus com del sistema immunològic de l'hoste (per molt que, en part, la resposta immunològica estigui compromesa).

Recentment determinats agents antivirals directes han estat aprovats per al tractament de la infecció pel virus C. Un coneixement detallat del cicle de vida del VHC i del rol que tenen determinades proteïnes virals i factors de l'hoste pot ajudar a trobar noves dianes o a millorar les opcions terapèutiques existents. Amb

aquest objectiu, diferents estudis han intentat caracteritzar la localització subcel·lular de les proteïnes del VHC amb la finalitat d'entendre com aquest s'apodera de determinades funcions cel·lulars i dels mecanismes implicats en la producció de partícules infeccioses. Miyanari *et al.* (145) van ser els primers en demostrar en VHCcc que les LD estan involucrades en la producció de partícules virals infeccioses. Observaren que la proteïna core, un cop sintetitzada al RE, és transportada a la superfície d'aquestes estructures citosòliques encarregades de l'emmagatzematge de lípids neutres. Des d'allà i amb l'ajuda d'NS5A, core recluta les proteïnes no estructurals i els complexos de replicació residents al RE cap a les membranes associades a les LD. També evidenciaren que les partícules virals es situen molt properes a les LD, el que indicava que alguns passos de l'assemblatge del virus tenien lloc al voltant d'aquests orgànuls cel·lulars. Consistent amb aquest model, s'ha vist que mutacions que impedeixen el trànsit de core cap a les LD inhibeixen l'assemblatge del virus (245, 246). A més, s'ha trobat que inhibidors farmacològics de la proteïna fosfolipasa A2 dependent de calci (cPLA2) i DGAT1, que són encarregades de la mobilització de core i la gènesi de les LD, bloquegen l'assemblatge i producció de partícules virals (95, 290).

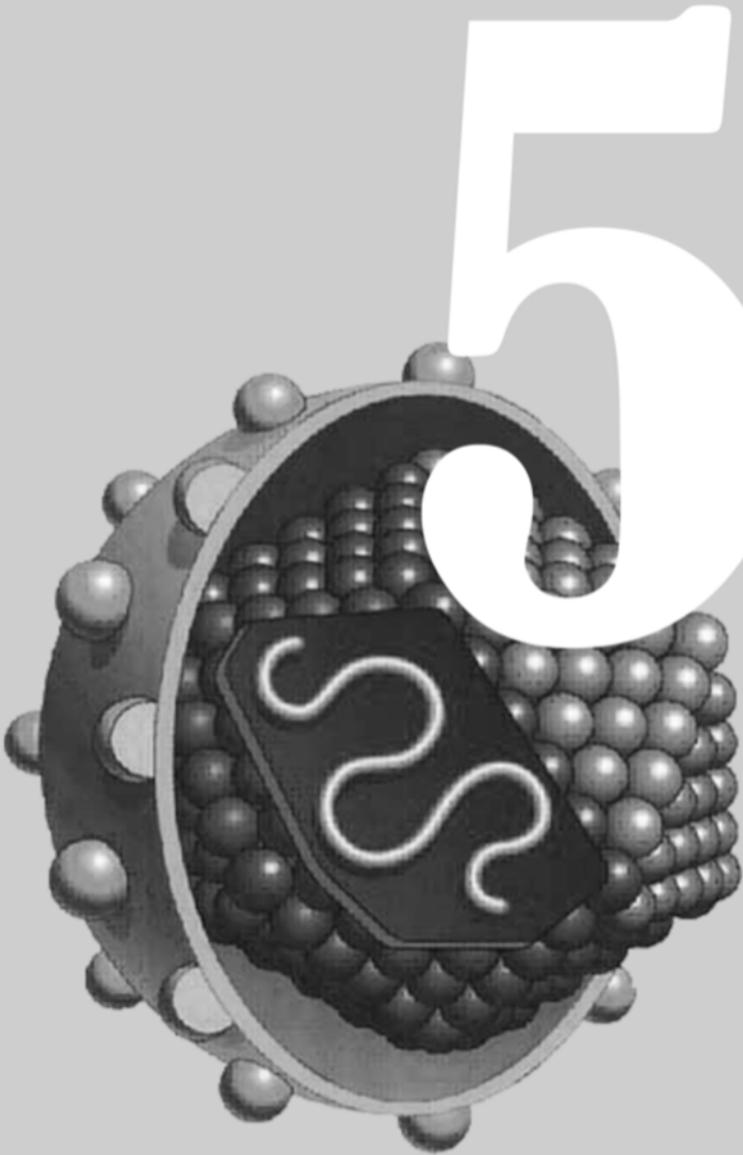
En el nostre estudi, en detectar en el citoplasma d'algunes cèl·lules la presència d'estructures circulars mitjançant la immunohistoquímica de core i NS5A, ens vam plantejar caracteritzar *in vivo* i per immunofluorescència la seva localització vs. la de l'adipofil·lina, proteïna constitutiva de les LD. La reconstrucció en tres dimensions d'aquest marcatge en hepatòcits individuals mostrà que un 55% del volum de core colocalitzava amb NS5A i un 66% d'NS5A colocalitzava amb core, formant estructures en forma d'anell de diversos diàmetres (0.84-4.87 μ m) en les que core es localitzava preferentment a la part més interna i NS5A a la perifèria. Quan estudiarem la disposició relativa d'NS5A vs. l'adipofil·lina observarem que un 36% del volum de la primera colocalitzava amb la segona i es disposava a la part més externa de la LD, el que està en consonància amb els estudis realitzats *in vitro* i dóna suport al rol d'aquestes estructures en la producció de partícules virals infeccioses.

Tot i que hem demostrat per primera vegada *in vivo*, en el marc del TH, l'expressió de determinats receptors involucrats en l'entrada i l'estreta relació existent entre algunes proteïnes virals i les LD, calen encara molts avenços per esbrinar com nombrosos coreceptors i factors d'entrada del VHC són requerits i s'usen en el temps i en l'espai així com clarificar el procés de formació de la nucleocàpside i la contribució de les proteïnes NS en l'assemblatge viral.

Finalment, destacar que en els treballs duts a terme en aquesta tesi existeixen algunes limitacions a nivell tècnic i metodològic que probablement siguin motiu de discrepància entre els nostres resultats i els obtinguts per altres grups. Per un costat, la qualitat de les proteïnes dels teixits fixats en formalina i preservats en parafina depèn de diversos factors que poden acabar influenciant el resultat final de la immunohistoquímica: el protocol de fixació (temps i solucions), les condicions de preservació (temperatura i llum) i l'antiguitat de la mostra són variables que determinen la possibilitat de recuperar les proteïnes, l'accessibilitat al reconeixement dels anticossos i la integritat dels àcids nucleics presents en el teixit. Com els dissenys dels nostres estudis són retrospectius, és important considerar l'heterogeneïtat de les mostres associada al llarg període de temps abastat (del 2001 al 2010). En segon lloc, les biòpsies de reperfusió obtingudes durant l'acte quirúrgic estan sotmeses a determinats factors d'estrès (temps d'isquèmia/reperfusió, solucions de preservació de l'òrgan, etc.) que poden alterar i condicionar el perfil d'expressió de proteïnes i àcids nucleics. És per això que les mostres de reperfusió, tot i que per un costat són el control negatiu més apropiat per a cada pacient, no les podem considerar del tot normals. Per últim, no ens hem d'oblidar que la quantificació d'expressió dels receptors es va fer fixant un llindar d'intensitat arbitrari únic per a cada un dels canals, el que podria haver contribuït, en algun cas, a la infravaloració d'alguna de les proteïnes d'estudi.

Un altre aspecte important a destacar és el del model del TH, el qual tot i ser un model únic i privilegiat per a l'estudi de l'evolució de la infecció del VHC, també s'hi associen desavantatges que no es poden menysprear. Un exemple d'això el tenim en els efectes de la teràpia immunosupressora administrada en aquest tipus de pacients. Segons l'estudi de Ciesek *et al.* (291), l'ús de glucocorticoids empitjora la

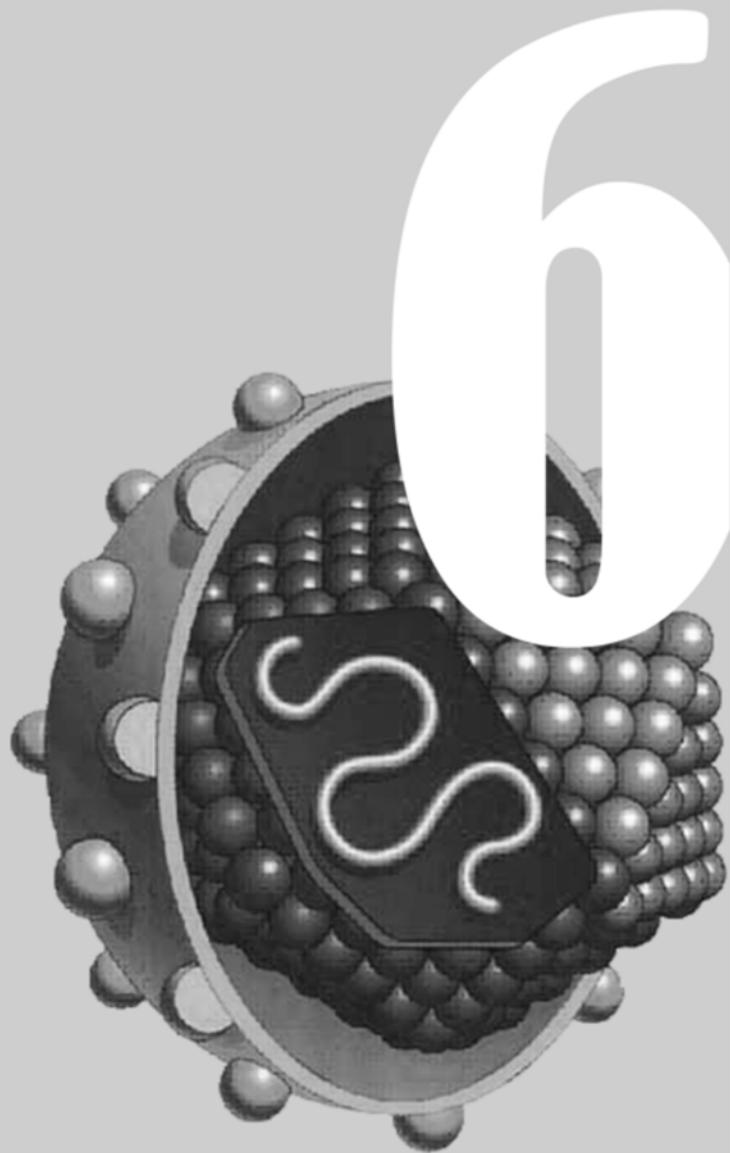
recurrència del VHC ja que incrementen l'abundància d'SR-B1 i OCLN. L'augment d'expressió d'aquests receptors es tradueix en un augment en l'entrada i disseminació del virus. A banda d'això, el grau de desigualtat entre pacients dels antígens leucocitaris humans i els seus efectes en el reconeixement d'antígens, factors genètics associats al donant, etc són altres variables que no podem menysprear.



CONCLUSIONS

1. Els estudis realitzats mitjançant tècniques d'immunofluorescència en teixit hepàtic fixat en formol i inclòs en parafina de pacients receptors d'un transplantament de fetge, mostren que el receptor SR-B1 es localitza al pol basolateral dels hepatòcits i CLDN1 i OCLN al pol apical.
2. El patró de distribució dels receptors SR-B1, CLDN1 i OCLN a la membrana citoplasmàtica dels hepatòcits resta constant després de la infecció del nou òrgan pel VHC.
3. Un any després del TH, la recurrència de la infecció pel VHC s'associa a un increment significatiu de l'expressió de CLDN1 i OCLN a la membrana citoplasmàtica. L'augment de CLDN1 és significativament més elevat en els pacients que desenvolupen una hepatitis colestatàtica.
4. L'expressió de SR-B1, CLDN1 i OCLN en el moment del TH modula la susceptibilitat de l'empelt a la infecció pel VHC, donada la influència d'aquests receptors en la cinètica viral precoç.
5. En mostres de teixit hepàtic parafinat, és possible detectar els antígens core i NS5A mitjançant immunofluorescència i immunohistoquímica, els quals s'expressen aleatòriament i amb diferents graus d'intensitat en el citoplasma dels hepatòcits.
6. La gravetat de la malaltia i els valors de càrrega viral en sang es relacionen amb la detecció de la proteïna core en el teixit hepàtic.
7. Hem demostrat, per primera vegada *in vivo*, la colocalització de core i NS5A al voltant de les *lipid droplets*. Aquest fet concorda amb estudis fets en cultiu cel·lular i dóna suport al rol d'aquestes estructures en la producció de partícules virals infeccioses.
8. Els resultats previament descrits poden ser rellevants a l'hora de dissenyar estratègies basades en l'ús d'anticossos o petites molècules que bloqueïgin els

receptors d'entrada o n'inhibeixin la seva expressió, amb l'objectiu de retrassar o prevenir la recurrència de la infecció post-TH. Així mateix, una millor comprensió de l'assemblatge del virus i dels factors de l'hoste que hi estan implicats, pot contribuir a la cerca de noves dianes terapèutiques i al desenvolupament d'una vacuna capaç d'eradicar la infecció.



BIBLIOGRAFIA

1. Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C., Bonino, F., and Verme, G. (1977) Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers, *Gut* 18, 997-1003.
2. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome, *Science* 244, 359-362.
3. Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J., Gitnick, G. L., Redeker, A. G., Purcell, R. H., Miyamura, T., Dienstag, J. L., Alter, M. J., Stevens, C. E., and et al. (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis, *Science* 244, 362-364.
4. Lavanchy, D. (2009) The global burden of hepatitis C, *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 29 Suppl 1, 74-81.
5. Karone, M. J., and Siika, A. M. (2013) Hepatitis C virus (HCV) infection in Africa: a review, *The Pan African medical journal* 14, 44.
6. Zaltron, S., Spinetti, A., Biasi, L., Baiguera, C., and Castelli, F. (2012) Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance, *BMC infectious diseases* 12 Suppl 2, S2.
7. Armstrong, G. L., Wasley, A., Simard, E. P., McQuillan, G. M., Kuhnert, W. L., and Alter, M. J. (2006) The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002, *Annals of internal medicine* 144, 705-714.
8. Hatzakis, A., Wait, S., Bruix, J., Buti, M., Carballo, M., Cavaleri, M., Colombo, M., Delarocque-Astagneau, E., Dusheiko, G., Esmat, G., Esteban, R., Goldberg, D., Gore, C., Lok, A. S., Manns, M., Marcellin, P., Papatheodoridis, G., Peterle, A., Prati, D., Piorkowsky, N., Rizzetto, M., Roudot-Thoraval, F., Soriano, V., Thomas, H. C., Thursz, M., Valla, D., van Damme, P., Veldhuijzen, I. K., Wedemeyer, H., Wiessing, L., Zanetti, A. R., and Janssen, H. L. (2011) The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference*, *Journal of viral hepatitis* 18 Suppl 1, 1-16.
9. Perez Cachafeiro, S., Del Amo, J., Iribarren, J. A., Salavert Lleti, M., Gutierrez, F., Moreno, A., Labarga, P., Pineda, J. A., Vidal, F., Berenguer, J., and Moreno, S. (2009) Decrease in serial prevalence of coinfection with hepatitis C virus among HIV-infected patients in Spain, 1997-2006, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48, 1467-1470.
10. Alavian, S. M. (2009) A shield against a monster: Hepatitis C in hemodialysis patients, *World journal of gastroenterology : WJG* 15, 641-646.
11. Martinez-Bauer, E., Forns, X., Armelles, M., Planas, R., Sola, R., Vergara, M., Fabregas, S., Vega, R., Salmeron, J., Diago, M., Sanchez-Tapias, J. M., and Bruguera, M. (2008) Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain, *Journal of hepatology* 48, 20-27.
12. Pellicano, R., De Angelis, C., De Luca, L., Smedile, A., Berrutti, M., Astegiano, M., and Rizzetto, M. (2009) Risk factors for HCV infection. Focus on ethnic and cultural characteristics, *Minerva gastroenterologica e dietologica* 55, 159-162.
13. van den Berg, C. H., van de Laar, T. J., Kok, A., Zuure, F. R., Coutinho, R. A., and Prins, M. (2009) Never injected, but hepatitis C virus-infected: a study among self-declared never-injecting drug users from the Amsterdam Cohort Studies, *Journal of viral hepatitis* 16, 568-577.

14. Rai, R. R., Mathur, A., Mathur, D., Udawat, H. P., Nepalia, S., Nijhawan, S., and Mathur, A. (2007) Prevalence of occult hepatitis B & C in HIV patients infected through sexual transmission, *Tropical gastroenterology : official journal of the Digestive Diseases Foundation* 28, 19-23.
15. Ruf, M., Cohuet, S., Maguire, H., Brant, L. J., Ramsay, M., Lattimore, S., and Delpech, V. (2008) Setting up an enhanced surveillance of newly acquired hepatitis C infection in men who have sex with men: a pilot in London and South East region of England, *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 13.
16. De Jesus-Caraballo, J., Toro, D. H., Rodriguez-Perez, F., Ruiz, H., Dueno, M. I., Alvarez, M., and Suarez-Perez, E. (2008) Sexual activity as a risk factor for hepatitis C in Puerto Rico, *Boletin de la Asociacion Medica de Puerto Rico* 100, 15-20.
17. Tohme, R. A., and Holmberg, S. D. (2010) Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission?, *Hepatology* 52, 1497-1505.
18. Baldo, V., Baldovin, T., Trivello, R., and Floreani, A. (2008) Epidemiology of HCV infection, *Current pharmaceutical design* 14, 1646-1654.
19. Murakami, J., Nagata, I., Iitsuka, T., Okamoto, M., Kaji, S., Hoshika, T., Matsuda, R., Kanzaki, S., Shiraki, K., Suyama, A., and Hino, S. (2012) Risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus: Maternal high viral load and fetal exposure in the birth canal, *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 42, 648-657.
20. Indolfi, G., and Resti, M. (2009) Perinatal transmission of hepatitis C virus infection, *Journal of medical virology* 81, 836-843.
21. Kuiken, C., and Simmonds, P. (2009) Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus, *Methods Mol Biol* 510, 33-53.
22. Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. (1992) Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution, *Journal of virology* 66, 3225-3229.
23. Murphy, D. G. C., J.; Dandavino, R.; Sablon, E. (2007) A new genotype of Hepatitis C Virus originating from Central Africa, p Suppl. 1:623.
24. Delaney, W. E. t. (2013) Molecular virology of chronic hepatitis B and C: Parallels, contrasts and impact on drug development and treatment outcome, *Antiviral research*.
25. Simmonds, P. (2004) Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on, *The Journal of general virology* 85, 3173-3188.
26. Hoofnagle, J. H. (2002) Course and outcome of hepatitis C, *Hepatology* 36, S21-29.
27. Chen, G., Gharib, T. G., Huang, C. C., Taylor, J. M., Misek, D. E., Kardia, S. L., Giordano, T. J., Iannettoni, M. D., Orringer, M. B., Hanash, S. M., and Beer, D. G. (2002) Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas, *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1, 304-313.
28. Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S. I., Alexander, G., Goedert, J. J., Kirk, G. D., Donfield, S. M., Rosen, H. R., Tobler, L. H., Busch, M. P., McHutchison, J. G., Goldstein, D. B., and Carrington, M. (2009) Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus, *Nature* 461, 798-801.
29. Davis, G. L., Dempster, J., Meler, J. D., Orr, D. W., Walberg, M. W., Brown, B., Berger, B. D., O'Connor, J. K., and Goldstein, R. M. (2008) Hepatocellular

- carcinoma: management of an increasingly common problem, *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 21, 266-280.
30. Missiha, S. B., Ostrowski, M., and Heathcote, E. J. (2008) Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors, *Gastroenterology* 134, 1699-1714.
 31. Neumann, U. P., Berg, T., Bahra, M., Seehofer, D., Langrehr, J. M., Neuhaus, R., Radke, C., and Neuhaus, P. (2004) Fibrosis progression after liver transplantation in patients with recurrent hepatitis C, *Journal of hepatology* 41, 830-836.
 32. Bochud, P. Y., Cai, T., Overbeck, K., Bochud, M., Dufour, J. F., Mullhaupt, B., Borovicka, J., Heim, M., Moradpour, D., Cerny, A., Malinverni, R., Francioli, P., and Negro, F. (2009) Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C, *Journal of hepatology* 51, 655-666.
 33. Serfaty, L., Aumaitre, H., Chazouilleres, O., Bonnard, A. M., Rosmorduc, O., Poupon, R. E., and Poupon, R. (1998) Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis, *Hepatology* 27, 1435-1440.
 34. Fattovich, G., Giustina, G., Degos, F., Tremolada, F., Diodati, G., Almasio, P., Nevens, F., Solinas, A., Mura, D., Brouwer, J. T., Thomas, H., Njapoum, C., Casarin, C., Bonetti, P., Fuschi, P., Basho, J., Tocco, A., Bhalla, A., Galassini, R., Noventa, F., Schalm, S. W., and Realdi, G. (1997) Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients, *Gastroenterology* 112, 463-472.
 35. Chen, S. L., and Morgan, T. R. (2006) The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection, *International journal of medical sciences* 3, 47-52.
 36. Chevaliez, S. (2011) Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection, *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 116-121.
 37. Bowen, D. G., and Walker, C. M. (2005) Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection, *Nature* 436, 946-952.
 38. Pawlotsky, J. M. (1999) Diagnostic tests for hepatitis C, *Journal of hepatology* 31 Suppl 1, 71-79.
 39. Park, Y., Lee, J. H., Kim, B. S., Kim do, Y., Han, K. H., and Kim, H. S. (2010) New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification, *Journal of clinical microbiology* 48, 2253-2256.
 40. Forns, X., and Costa, J. (2006) HCV virological assessment, *Journal of hepatology* 44, S35-39.
 41. Ross, R. S., Viazov, S., Salloum, S., Hilgard, P., Gerken, G., and Roggendorf, M. (2010) Analytical performance characteristics and clinical utility of a novel assay for total hepatitis C virus core antigen quantification, *Journal of clinical microbiology* 48, 1161-1168.
 42. Moscato, G. A., Giannelli, G., Grandi, B., Pieri, D., Marsi, O., Guarducci, I., Batini, I., Altomare, E., Antonaci, S., Capria, A., Pellegrini, G., and Sacco, R. (2011) Quantitative determination of hepatitis C core antigen in therapy monitoring for chronic hepatitis C, *Intervirolology* 54, 61-65.
 43. Pawlotsky, J. M. (2002) Use and interpretation of virological tests for hepatitis C, *Hepatology* 36, S65-73.
 44. Berenguer, M. (2002) Natural history of recurrent hepatitis C, *Liver transplantation : official publication of the American Association for the*

- Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society 8*, S14-18.
45. Hughes, M. G., Jr., and Rosen, H. R. (2009) Human liver transplantation as a model to study hepatitis C virus pathogenesis, *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society 15*, 1395-1411.
 46. Pal, S., Sullivan, D. G., Kim, S., Lai, K. K., Kae, J., Cotler, S. J., Carithers, R. L., Jr., Wood, B. L., Perkins, J. D., and Gretch, D. R. (2006) Productive replication of hepatitis C virus in perihepatic lymph nodes in vivo: implications of HCV lymphotropism, *Gastroenterology 130*, 1107-1116.
 47. Garcia-Retortillo, M., Forns, X., Feliu, A., Moitinho, E., Costa, J., Navasa, M., Rimola, A., and Rodes, J. (2002) Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation, *Hepatology 35*, 680-687.
 48. Forns, X., Purcell, R. H., and Bukh, J. (1999) Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus, *Trends in microbiology 7*, 402-410.
 49. Gordon, S. C., Dailey, P. J., Silverman, A. L., Khan, B. A., Kodali, V. P., and Wilber, J. C. (1998) Sequential serum hepatitis C viral RNA levels longitudinally assessed by branched DNA signal amplification, *Hepatology 28*, 1702-1706.
 50. Powers, K. A., Ribeiro, R. M., Patel, K., Pianko, S., Nyberg, L., Pockros, P., Conrad, A. J., McHutchison, J., and Perelson, A. S. (2006) Kinetics of hepatitis C virus reinfection after liver transplantation, *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society 12*, 207-216.
 51. Hsu, S. H., Wang, L. T., Lee, K. T., Chen, Y. L., Liu, K. Y., Suen, J. L., Chai, C. Y., and Wang, S. N. (2013) Proinflammatory homeobox gene, ISX, regulates tumor growth and survival in hepatocellular carcinoma, *Cancer research 73*, 508-518.
 52. Crespo, G., Marino, Z., Navasa, M., and Forns, X. (2012) Viral hepatitis in liver transplantation, *Gastroenterology 142*, 1373-1383 e1371.
 53. Carrion, J. A., Torres, F., Crespo, G., Miquel, R., Garcia-Valdecasas, J. C., Navasa, M., and Forns, X. (2010) Liver stiffness identifies two different patterns of fibrosis progression in patients with hepatitis C virus recurrence after liver transplantation, *Hepatology 51*, 23-34.
 54. Forns, X., Garcia-Retortillo, M., Serrano, T., Feliu, A., Suarez, F., de la Mata, M., Garcia-Valdecasas, J. C., Navasa, M., Rimola, A., and Rodes, J. (2003) Antiviral therapy of patients with decompensated cirrhosis to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation, *Journal of hepatology 39*, 389-396.
 55. Terrault, N. (2012) Liver transplantation in the setting of chronic HCV, *Best practice & research. Clinical gastroenterology 26*, 531-548.
 56. Ghany, M. G., Nelson, D. R., Strader, D. B., Thomas, D. L., and Seeff, L. B. (2011) An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, *Hepatology 54*, 1433-1444.
 57. Carrion, J. A., Martinez-Bauer, E., Crespo, G., Ramirez, S., Perez-del-Pulgar, S., Garcia-Valdecasas, J. C., Navasa, M., and Forns, X. (2009) Antiviral therapy increases the risk of bacterial infections in HCV-infected cirrhotic patients awaiting liver transplantation: A retrospective study, *Journal of hepatology 50*, 719-728.

58. Everson, G. T., Terrault, N. A., Lok, A. S., Rodrigo del, R., Brown, R. S., Jr., Saab, S., Shiffman, M. L., Al-Osaimi, A. M., Kulik, L. M., Gillespie, B. W., and Everhart, J. E. (2013) A randomized controlled trial of pretransplant antiviral therapy to prevent recurrence of hepatitis C after liver transplantation, *Hepatology* 57, 1752-1762.
59. Chang, M. H., Gordon, L. A., and Fung, H. B. (2012) Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C, *Clinical therapeutics* 34, 2021-2038.
60. Forestier, N., and Zeuzem, S. (2012) Telaprevir for the treatment of hepatitis C, *Expert opinion on pharmacotherapy* 13, 593-606.
61. Lee, L. Y., Tong, C. Y., Wong, T., and Wilkinson, M. (2012) New therapies for chronic hepatitis C infection: a systematic review of evidence from clinical trials, *International journal of clinical practice* 66, 342-355.
62. Pawlotsky, J. M. (2013) Treatment of chronic hepatitis C: current and future, *Current topics in microbiology and immunology* 369, 321-342.
63. Chatel-Chaix, L., Germain, M. A., Gotte, M., and Lamarre, D. (2012) Direct-acting and host-targeting HCV inhibitors: current and future directions, *Current opinion in virology* 2, 588-598.
64. Aghemo, A., Degasperis, E., and Colombo, M. (2013) Directly acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis C: unresolved topics from registration trials, *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 45, 1-7.
65. Chae, H. B., Park, S. M., and Youn, S. J. (2013) Direct-acting antivirals for the treatment of chronic hepatitis C: open issues and future perspectives, *TheScientificWorldJournal* 2013, 704912.
66. McCown, M. F., Rajyaguru, S., Le Pogam, S., Ali, S., Jiang, W. R., Kang, H., Symons, J., Cammack, N., and Najera, I. (2008) The hepatitis C virus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to nonnucleoside polymerase or protease inhibitors, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 1604-1612.
67. Gane, E. J., Stedman, C. A., Hyland, R. H., Ding, X., Svarovskaia, E., Symonds, W. T., Hindes, R. G., and Berrey, M. M. (2013) Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C, *The New England journal of medicine* 368, 34-44.
68. Gu, B., Johnston, V. K., Gutshall, L. L., Nguyen, T. T., Gontarek, R. R., Darcy, M. G., Tedesco, R., Dhanak, D., Duffy, K. J., Kao, C. C., and Sarisky, R. T. (2003) Arresting initiation of hepatitis C virus RNA synthesis using heterocyclic derivatives, *The Journal of biological chemistry* 278, 16602-16607.
69. Lemm, J. A., O'Boyle, D., 2nd, Liu, M., Nower, P. T., Colonna, R., Deshpande, M. S., Snyder, L. B., Martin, S. W., St Laurent, D. R., Serrano-Wu, M. H., Romine, J. L., Meanwell, N. A., and Gao, M. (2010) Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors, *Journal of virology* 84, 482-491.
70. Targett-Adams, P., Graham, E. J., Middleton, J., Palmer, A., Shaw, S. M., Lavender, H., Brain, P., Tran, T. D., Jones, L. H., Wakenhut, F., Stammen, B., Pryde, D., Pickford, C., and Westby, M. (2011) Small molecules targeting hepatitis C virus-encoded NS5A cause subcellular redistribution of their target: insights into compound modes of action, *Journal of virology* 85, 6353-6368.
71. Reiss, S., Rebhan, I., Backes, P., Romero-Brey, I., Erfle, H., Matula, P., Kaderali, L., Poenisch, M., Blankenburg, H., Hiet, M. S., Longerich, T., Diehl, S., Ramirez,

- F., Balla, T., Rohr, K., Kaul, A., Buhler, S., Pepperkok, R., Lengauer, T., Albrecht, M., Eils, R., Schirmacher, P., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2011) Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment, *Cell host & microbe* 9, 32-45.
72. Kohler, J. J., Nettles, J. H., Amblard, F., Hurwitz, S. J., Bassit, L., Stanton, R. A., Ehteshami, M., and Schinazi, R. F. (2014) Approaches to hepatitis C treatment and cure using NS5A inhibitors, *Infection and drug resistance* 7, 41-56.
73. Gao, M., Nettles, R. E., Belema, M., Snyder, L. B., Nguyen, V. N., Fridell, R. A., Serrano-Wu, M. H., Langley, D. R., Sun, J. H., O'Boyle, D. R., 2nd, Lemm, J. A., Wang, C., Knipe, J. O., Chien, C., Colonna, R. J., Grasela, D. M., Meanwell, N. A., and Hamann, L. G. (2010) Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect, *Nature* 465, 96-100.
74. Matsumura, T., Kato, T., Sugiyama, N., Tasaka-Fujita, M., Murayama, A., Masaki, T., Wakita, T., and Imawari, M. (2012) 25-Hydroxyvitamin D3 suppresses hepatitis C virus production, *Hepatology* 56, 1231-1239.
75. Ni, F., Kota, S., Takahashi, V., Strosberg, A. D., and Snyder, J. K. (2011) Potent inhibitors of hepatitis C core dimerization as new leads for anti-hepatitis C agents, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 21, 2198-2202.
76. Kota, S., Takahashi, V., Ni, F., Snyder, J. K., and Strosberg, A. D. (2012) Direct binding of a hepatitis C virus inhibitor to the viral capsid protein, *PLoS one* 7, e32207.
77. Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2010) Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy, *Viruses* 2, 2078-2095.
78. Griffin, S., Stgelais, C., Owsianka, A. M., Patel, A. H., Rowlands, D., and Harris, M. (2008) Genotype-dependent sensitivity of hepatitis C virus to inhibitors of the p7 ion channel, *Hepatology* 48, 1779-1790.
79. Steinmann, E., Whitfield, T., Kallis, S., Dwek, R. A., Zitzmann, N., Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2007) Antiviral effects of amantadine and iminosugar derivatives against hepatitis C virus, *Hepatology* 46, 330-338.
80. Einav, S., Sobol, H. D., Gehrig, E., and Glenn, J. S. (2010) The hepatitis C virus (HCV) NS4B RNA binding inhibitor clemizole is highly synergistic with HCV protease inhibitors, *The Journal of infectious diseases* 202, 65-74.
81. Bryson, P. D., Cho, N. J., Einav, S., Lee, C., Tai, V., Bechtel, J., Sivaraja, M., Roberts, C., Schmitz, U., and Glenn, J. S. (2010) A small molecule inhibits HCV replication and alters NS4B's subcellular distribution, *Antiviral research* 87, 1-8.
82. Martinand-Mari, C., Lebleu, B., and Robbins, I. (2003) Oligonucleotide-based strategies to inhibit human hepatitis C virus, *Oligonucleotides* 13, 539-548.
83. Fafi-Kremer, S., Fauvelle, C., Felmlee, D. J., Zeisel, M. B., Lepiller, Q., Fofana, I., Heydmann, L., Stoll-Keller, F., and Baumert, T. F. (2012) Neutralizing antibodies and pathogenesis of hepatitis C virus infection, *Viruses* 4, 2016-2030.
84. Law, M., Maruyama, T., Lewis, J., Giang, E., Tarr, A. W., Stamataki, Z., Gastaminza, P., Chisari, F. V., Jones, I. M., Fox, R. I., Ball, J. K., McKeating, J. A., Kneteman, N. M., and Burton, D. R. (2008) Broadly neutralizing antibodies

- protect against hepatitis C virus quasispecies challenge, *Nature medicine* 14, 25-27.
85. Dorner, M., Horwitz, J. A., Robbins, J. B., Barry, W. T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C. T., Schoggins, J. W., Catanese, M. T., Burton, D. R., Law, M., Rice, C. M., and Ploss, A. (2011) A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection, *Nature* 474, 208-211.
 86. Garrone, P., Fluckiger, A. C., Mangeot, P. E., Gauthier, E., Dupeyrot-Lacas, P., Mancip, J., Cangialosi, A., Du Chene, I., LeGrand, R., Mangeot, I., Lavillette, D., Bellier, B., Cosset, F. L., Tangy, F., Klatzmann, D., and Dalba, C. (2011) A prime-boost strategy using virus-like particles pseudotyped for HCV proteins triggers broadly neutralizing antibodies in macaques, *Science translational medicine* 3, 94ra71.
 87. Giang, E., Dorner, M., Prentoe, J. C., Dreux, M., Evans, M. J., Bukh, J., Rice, C. M., Ploss, A., Burton, D. R., and Law, M. (2012) Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6205-6210.
 88. Coelmont, L., Kaptein, S., Paeshuyse, J., Vliegen, I., Dumont, J. M., Vuagniaux, G., and Neyts, J. (2009) Debio 025, a cyclophilin binding molecule, is highly efficient in clearing hepatitis C virus (HCV) replicon-containing cells when used alone or in combination with specifically targeted antiviral therapy for HCV (STAT-C) inhibitors, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 967-976.
 89. Lawitz, E., Godofsky, E., Rouzier, R., Marbury, T., Nguyen, T., Ke, J., Huang, M., Praestgaard, J., Serra, D., and Evans, T. G. (2011) Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of the cyclophilin inhibitor NIM811 alone or in combination with pegylated interferon in HCV-infected patients receiving 14 days of therapy, *Antiviral research* 89, 238-245.
 90. Hopkins, S., Bobardt, M., Chatterji, U., Garcia-Rivera, J. A., Lim, P., and Galloway, P. A. (2012) The cyclophilin inhibitor SCY-635 disrupts hepatitis C virus NS5A-cyclophilin A complexes, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 3888-3897.
 91. Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., and Sarnow, P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA, *Science* 309, 1577-1581.
 92. Janssen, H. L., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A. J., Patick, A. K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B. D., Kauppinen, S., Levin, A. A., and Hodges, M. R. (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA, *The New England journal of medicine* 368, 1685-1694.
 93. Bianco, A., Reghellin, V., Donnici, L., Fenu, S., Alvarez, R., Baruffa, C., Peri, F., Pagani, M., Abrignani, S., Neddermann, P., and De Francesco, R. (2012) Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha-dependent PI4P Is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity, *PLoS pathogens* 8, e1002576.
 94. Borawski, J., Troke, P., Puyang, X., Gibaja, V., Zhao, S., Mickanin, C., Leighton-Davies, J., Wilson, C. J., Myer, V., Cornellataracido, I., Baryza, J., Tallarico, J., Joberty, G., Bantscheff, M., Schirle, M., Bouwmeester, T., Mathy, J. E., Lin, K., Compton, T., Labow, M., Wiedmann, B., and Gaither, L. A. (2009) Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor

- regulators of hepatitis C virus replication, *Journal of virology* 83, 10058-10074.
95. Herker, E., Harris, C., Hernandez, C., Carpentier, A., Kaehlcke, K., Rosenberg, A. R., Farese, R. V., Jr., and Ott, M. (2010) Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1, *Nature medicine* 16, 1295-1298.
 96. Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., Jr., and Ye, J. (2007) Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5848-5853.
 97. Nahmias, Y., Goldwasser, J., Casali, M., van Poll, D., Wakita, T., Chung, R. T., and Yarmush, M. L. (2008) Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin, *Hepatology* 47, 1437-1445.
 98. Catanese, M. T., Graziani, R., von Hahn, T., Moreau, M., Huby, T., Paonessa, G., Santini, C., Luzzago, A., Rice, C. M., Cortese, R., Vitelli, A., and Nicosia, A. (2007) High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein, *Journal of virology* 81, 8063-8071.
 99. Meuleman, P., and Leroux-Roels, G. (2008) The human liver-uPA-SCID mouse: a model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV, *Antiviral research* 80, 231-238.
 100. Fofana, I., Krieger, S. E., Grunert, F., Glaubens, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., Mee, C. J., McKeating, J. A., Dragic, T., Pessaux, P., Stoll-Keller, F., Schuster, C., Thompson, J., and Baumert, T. F. (2010) Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes, *Gastroenterology* 139, 953-964, 964 e951-954.
 101. Brimacombe, C. L., Grove, J., Meredith, L. W., Hu, K., Syder, A. J., Flores, M. V., Timpe, J. M., Krieger, S. E., Baumert, T. F., Tellinghuisen, T. L., Wong-Staal, F., Balfe, P., and McKeating, J. A. (2011) Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission, *Journal of virology* 85, 596-605.
 102. Meuleman, P., Catanese, M. T., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, C. T., Sheahan, T., Grzyb, K., Cortese, R., Rice, C. M., Leroux-Roels, G., and Nicosia, A. (2012) A human monoclonal antibody targeting scavenger receptor class B type I precludes hepatitis C virus infection and viral spread in vitro and in vivo, *Hepatology* 55, 364-372.
 103. Syder, A. J., Lee, H., Zeisel, M. B., Grove, J., Soulier, E., Macdonald, J., Chow, S., Chang, J., Baumert, T. F., McKeating, J. A., McKelvy, J., and Wong-Staal, F. (2011) Small molecule scavenger receptor BI antagonists are potent HCV entry inhibitors, *Journal of hepatology* 54, 48-55.
 104. Zhu, H., Wong-Staal, F., Lee, H., Syder, A., McKelvy, J., Schooley, R. T., and Wyles, D. L. (2012) Evaluation of ITX 5061, a scavenger receptor B1 antagonist: resistance selection and activity in combination with other hepatitis C virus antivirals, *The Journal of infectious diseases* 205, 656-662.
 105. Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C. J., Turek, M., Gorke, S., Royer, C., Fischer, B., Zahid, M. N., Lavillette, D., Fresquet, J., Cosset, F. L., Rothenberg, S. M., Pietschmann, T., Patel, A. H., Pessaux, P., Doffoel, M., Raffelsberger, W., Poch, O., McKeating, J. A., Brino, L., and Baumert, T. F. (2011) EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C

- virus entry and possible targets for antiviral therapy, *Nature medicine* 17, 589-595.
106. Sainz, B., Jr., Barretto, N., Martin, D. N., Hiraga, N., Imamura, M., Hussain, S., Marsh, K. A., Yu, X., Chayama, K., Alrefai, W. A., and Uprichard, S. L. (2012) Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor, *Nature medicine* 18, 281-285.
 107. Drexler, J. F., Corman, V. M., Muller, M. A., Lukashev, A. N., Gmyl, A., Coutard, B., Adam, A., Ritz, D., Leijten, L. M., van Riel, D., Kallies, R., Kloese, S. M., Gloza-Rausch, F., Binger, T., Annan, A., Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S., Bourgarel, M., Rupp, D., Hoffmann, B., Schlegel, M., Kummerer, B. M., Kruger, D. H., Schmidt-Chanasit, J., Setien, A. A., Cottontail, V. M., Hemachudha, T., Wacharapluesadee, S., Osterrieder, K., Bartenschlager, R., Matthee, S., Beer, M., Kuiken, T., Reusken, C., Leroy, E. M., Ulrich, R. G., and Drosten, C. (2013) Evidence for novel hepaciviruses in rodents, *PLoS pathogens* 9, e1003438.
 108. Bradley, D. W., McCaustland, K. A., Cook, E. H., Schable, C. A., Ebert, J. W., and Maynard, J. E. (1985) Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus, *Gastroenterology* 88, 773-779.
 109. He, L. F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H. J., and Purcell, R. H. (1987) Determining the size of non-A, non-B hepatitis virus by filtration, *The Journal of infectious diseases* 156, 636-640.
 110. Jacob, J. R., Burk, K. H., Eichberg, J. W., Dreesman, G. R., and Lanford, R. E. (1990) Expression of infectious viral particles by primary chimpanzee hepatocytes isolated during the acute phase of non-A, non-B hepatitis, *The Journal of infectious diseases* 161, 1121-1127.
 111. Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., Yokoi, M., Ishida, S., Suzuki, S., and Kohara, M. (1994) Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study, *The Journal of general virology* 75 (Pt 7), 1755-1760.
 112. Shimizu, Y. K., Feinstone, S. M., Kohara, M., Purcell, R. H., and Yoshikura, H. (1996) Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy, *Hepatology* 23, 205-209.
 113. Yuasa, T., Ishikawa, G., Manabe, S., Sekiguchi, S., Takeuchi, K., and Miyamura, T. (1991) The particle size of hepatitis C virus estimated by filtration through microporous regenerated cellulose fibre, *The Journal of general virology* 72 (Pt 8), 2021-2024.
 114. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Krausslich, H. G., Mizokami, M., Bartenschlager, R., and Liang, T. J. (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome, *Nature medicine* 11, 791-796.
 115. Catanese, M. T., Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T. J., Andrus, L., Rice, W. J., Silvestry, M., Kuhn, R. J., and Rice, C. M. (2013) Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
 116. Gastaminza, P., Dryden, K. A., Boyd, B., Wood, M. R., Law, M., Yeager, M., and Chisari, F. V. (2010) Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture, *Journal of virology* 84, 10999-11009.

117. Andre, P., Perlemuter, G., Budkowska, A., Brechot, C., and Lotteau, V. (2005) Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism, *Seminars in liver disease* 25, 93-104.
118. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (1993) Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products, *Journal of virology* 67, 1385-1395.
119. Griffin, S., Clarke, D., McCormick, C., Rowlands, D., and Harris, M. (2005) Signal peptide cleavage and internal targeting signals direct the hepatitis C virus p7 protein to distinct intracellular membranes, *Journal of virology* 79, 15525-15536.
120. Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I., and Okayama, H. (1991) Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers, *Journal of virology* 65, 1105-1113.
121. Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C. G., Fehr, C., Junemann, C., and Niepmann, M. (2008) microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA, *The EMBO journal* 27, 3300-3310.
122. Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. J., Sugiyama, K., and Shimotohno, K. (1996) Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome, *Journal of virology* 70, 3307-3312.
123. Moradpour, D., and Penin, F. (2013) Hepatitis C virus proteins: from structure to function, *Current topics in microbiology and immunology* 369, 113-142.
124. de Chasse, B., Navratil, V., Tafforeau, L., Hiet, M. S., Aublin-Gex, A., Agaue, S., Meiffren, G., Pradezynski, F., Faria, B. F., Chantier, T., Le Breton, M., Pellet, J., Davoust, N., Mangeot, P. E., Chaboud, A., Penin, F., Jacob, Y., Vidalain, P. O., Vidal, M., Andre, P., Rabourdin-Combe, C., and Lotteau, V. (2008) Hepatitis C virus infection protein network, *Molecular systems biology* 4, 230.
125. Boulant, S., Montserret, R., Hope, R. G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J. P., Penin, F., and McLauchlan, J. (2006) Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets, *The Journal of biological chemistry* 281, 22236-22247.
126. Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K. (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice, *Nature medicine* 4, 1065-1067.
127. McMullan, L. K., Grakoui, A., Evans, M. J., Mihalik, K., Puig, M., Branch, A. D., Feinstone, S. M., and Rice, C. M. (2007) Evidence for a functional RNA element in the hepatitis C virus core gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2879-2884.
128. Dalagiorgou, G., Vassilaki, N., Foka, P., Boumlic, A., Kakkanas, A., Kochlios, E., Khalili, S., Aslanoglou, E., Veletza, S., Orfanoudakis, G., Vassilopoulos, D., Hadziyannis, S. J., Koskinas, J., and Mavromara, P. (2011) High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma, *The Journal of general virology* 92, 1343-1351.
129. Mazumdar, B., Banerjee, A., Meyer, K., and Ray, R. (2011) Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes, *Hepatology* 54, 1149-1156.
130. Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H. J., and Purcell, R. H. (1996) Prevention of

- hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 15394-15399.
131. Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., and Vitelli, A. (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus, *The EMBO journal* 21, 5017-5025.
 132. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A. J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., and Abrignani, S. (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81, *Science* 282, 938-941.
 133. Sakai, A., Claire, M. S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., and Bukh, J. (2003) The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 11646-11651.
 134. Wozniak, A. L., Griffin, S., Rowlands, D., Harris, M., Yi, M., Lemon, S. M., and Weinman, S. A. (2010) Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production, *PLoS pathogens* 6, e1001087.
 135. Griffin, S. D., Beales, L. P., Clarke, D. S., Worsfold, O., Evans, S. D., Jaeger, J., Harris, M. P., and Rowlands, D. J. (2003) The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine, *FEBS letters* 535, 34-38.
 136. Moradpour, D., Penin, F., and Rice, C. M. (2007) Replication of hepatitis C virus, *Nature reviews. Microbiology* 5, 453-463.
 137. Jirasko, V., Montserret, R., Lee, J. Y., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Penin, F., and Bartenschlager, R. (2010) Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly, *PLoS pathogens* 6, e1001233.
 138. Li, K., Foy, E., Ferreon, J. C., Nakamura, M., Ferreon, A. C., Ikeda, M., Ray, S. C., Gale, M., Jr., and Lemon, S. M. (2005) Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2992-2997.
 139. Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus, *Nature* 437, 1167-1172.
 140. Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A. D., Le, H. V., and Weber, P. C. (1997) Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain, *Nature structural biology* 4, 463-467.
 141. Ma, Y., Yates, J., Liang, Y., Lemon, S. M., and Yi, M. (2008) NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly, *Journal of virology* 82, 7624-7639.
 142. Pietschmann, T., Zayas, M., Meuleman, P., Long, G., Appel, N., Koutsoudakis, G., Kallis, S., Leroux-Roels, G., Lohmann, V., and Bartenschlager, R. (2009) Production of infectious genotype 1b virus particles in cell culture and impairment by replication enhancing mutations, *PLoS pathogens* 5, e1000475.

143. Einav, S., Elazar, M., Danieli, T., and Glenn, J. S. (2004) A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication, *Journal of virology* 78, 11288-11295.
144. Tellinghuisen, T. L., Foss, K. L., and Treadaway, J. (2008) Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein, *PLoS pathogens* 4, e1000032.
145. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production, *Nature cell biology* 9, 1089-1097.
146. He, Y., Staschke, K. A., and Tan, S. L. (2006) HCV NS5A: A Multifunctional Regulator of Cellular Pathways and Virus Replication, In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (Tan, S. L., Ed.), Norfolk (UK).
147. Gale, M. J., Jr., Korth, M. J., Tang, N. M., Tan, S. L., Hopkins, D. A., Dever, T. E., Polyak, S. J., Gretch, D. R., and Katze, M. G. (1997) Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein, *Virology* 230, 217-227.
148. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F., and Sato, C. (1996) Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection, *The New England journal of medicine* 334, 77-81.
149. Gale, M., Jr., Kwieciszewski, B., Dossett, M., Nakao, H., and Katze, M. G. (1999) Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase, *Journal of virology* 73, 6506-6516.
150. Lan, K. H., Sheu, M. L., Hwang, S. J., Yen, S. H., Chen, S. Y., Wu, J. C., Wang, Y. J., Kato, N., Omata, M., Chang, F. Y., and Lee, S. D. (2002) HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis, *Oncogene* 21, 4801-4811.
151. Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2008) Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles, *Journal of virology* 82, 7964-7976.
152. Kakuk, A., Friedlander, E., Vereb, G., Jr., Kasa, A., Balla, A., Balla, T., Heilmeyer, L. M., Jr., Gergely, P., and Vereb, G. (2006) Nucleolar localization of phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 in various mammalian cells, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 69, 1174-1183.
153. Wong, K., Meyers dd, R., and Cantley, L. C. (1997) Subcellular locations of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms, *The Journal of biological chemistry* 272, 13236-13241.
154. Lesburg, C. A., Cable, M. B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A. F., and Weber, P. C. (1999) Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site, *Nature structural biology* 6, 937-943.
155. Bukh, J. (2004) A critical role for the chimpanzee model in the study of hepatitis C, *Hepatology* 39, 1469-1475.

156. Xie, Z. C., Riezu-Boj, J. I., Lasarte, J. J., Guillen, J., Su, J. H., Civeira, M. P., and Prieto, J. (1998) Transmission of hepatitis C virus infection to tree shrews, *Virology* 244, 513-520.
157. Amako, Y., Tsukiyama-Kohara, K., Katsume, A., Hirata, Y., Sekiguchi, S., Tobita, Y., Hayashi, Y., Hishima, T., Funata, N., Yonekawa, H., and Kohara, M. (2010) Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri*, *Journal of virology* 84, 303-311.
158. Mercer, D. F., Schiller, D. E., Elliott, J. F., Douglas, D. N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W. R., Fischer, K. P., Churchill, T. A., Lakey, J. R., Tyrrell, D. L., and Kneteman, N. M. (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers, *Nature medicine* 7, 927-933.
159. Vanwolleghem, T., Bukh, J., Meuleman, P., Desombere, I., Meunier, J. C., Alter, H., Purcell, R. H., and Leroux-Roels, G. (2008) Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain, *Hepatology* 47, 1846-1855.
160. Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P., and Rice, C. M. (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells, *Nature* 457, 882-886.
161. Pietschmann, T., and Bartenschlager, R. (2003) Tissue culture and animal models for hepatitis C virus, *Clinics in liver disease* 7, 23-43.
162. Seipp, S., Mueller, H. M., Pfaff, E., Stremmel, W., Theilmann, L., and Goeser, T. (1997) Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication in vitro, *The Journal of general virology* 78 (Pt 10), 2467-2476.
163. Blight, K. J., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2002) Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication, *Journal of virology* 76, 13001-13014.
164. Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C. C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture, *Science* 309, 623-626.
165. Mee, C. J., Harris, H. J., Farquhar, M. J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van, I. S. C., Balfe, P., and McKeating, J. A. (2009) Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells, *Journal of virology* 83, 6211-6221.
166. Narbus, C. M., Israelow, B., Sourisseau, M., Michta, M. L., Hopcraft, S. E., Zeiner, G. M., and Evans, M. J. (2011) HepG2 cells expressing microRNA miR-122 support the entire hepatitis C virus life cycle, *Journal of virology* 85, 12087-12092.
167. Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F. L. (2003) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes, *The Journal of experimental medicine* 197, 633-642.
168. Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7271-7276.
169. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., and Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line, *Science* 285, 110-113.

170. He, Y., King, M. S., Kempf, D. J., Lu, L., Lim, H. B., Krishnan, P., Kati, W., Middleton, T., and Molla, A. (2008) Relative replication capacity and selective advantage profiles of protease inhibitor-resistant hepatitis C virus (HCV) NS3 protease mutants in the HCV genotype 1b replicon system, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 1101-1110.
171. Flint, M., Mullen, S., Deatly, A. M., Chen, W., Miller, L. Z., Ralston, R., Broom, C., Emini, E. A., and Howe, A. Y. (2009) Selection and characterization of hepatitis C virus replicons dually resistant to the polymerase and protease inhibitors HCV-796 and boceprevir (SCH 503034), *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 401-411.
172. Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., and Moradpour, D. (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons, *Journal of virology* 77, 5487-5492.
173. Aizaki, H., Lee, K. J., Sung, V. M., Ishiko, H., and Lai, M. M. (2004) Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts, *Virology* 324, 450-461.
174. Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, S. S., Zhang, B., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. (2008) Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins, *Biochemical and biophysical research communications* 371, 446-450.
175. Steinmann, E., Brohm, C., Kallis, S., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2008) Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles, *Journal of virology* 82, 7034-7046.
176. Adair, R., Patel, A. H., Corless, L., Griffin, S., Rowlands, D. J., and McCormick, C. J. (2009) Expression of hepatitis C virus (HCV) structural proteins in trans facilitates encapsidation and transmission of HCV subgenomic RNA, *The Journal of general virology* 90, 833-842.
177. Pacini, L., Graziani, R., Bartholomew, L., De Francesco, R., and Paonessa, G. (2009) Naturally occurring hepatitis C virus subgenomic deletion mutants replicate efficiently in Huh-7 cells and are trans-packaged in vitro to generate infectious defective particles, *Journal of virology* 83, 9079-9093.
178. Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., and Bartenschlager, R. (2002) Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture, *Journal of virology* 76, 4008-4021.
179. Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D. R., Wieland, S. F., Uprichard, S. L., Wakita, T., and Chisari, F. V. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9294-9299.
180. Kato, T., Furusaka, A., Miyamoto, M., Date, T., Yasui, K., Hiramoto, J., Nagayama, K., Tanaka, T., and Wakita, T. (2001) Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient, *Journal of medical virology* 64, 334-339.
181. Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F. L., and Bartenschlager, R. (2006) Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras, *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7408-7413.
182. Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Hoegh, A. M., Lademann, J. B., Eugen-Olsen, J., Lisby, G., and Bukh, J. (2007) Robust hepatitis C genotype 3a cell culture releasing adapted intergenotypic 3a/2a (S52/JFH1) viruses, *Gastroenterology* 133, 1614-1626.
 183. Yi, M., Ma, Y., Yates, J., and Lemon, S. M. (2007) Compensatory mutations in E1, p7, NS2, and NS3 enhance yields of cell culture-infectious intergenotypic chimeric hepatitis C virus, *Journal of virology* 81, 629-638.
 184. Jensen, T. B., Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Hoegh, A. M., Eugen-Olsen, J., and Bukh, J. (2008) Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection, *The Journal of infectious diseases* 198, 1756-1765.
 185. Scheel, T. K., Gottwein, J. M., Jensen, T. B., Prentoe, J. C., Hoegh, A. M., Alter, H. J., Eugen-Olsen, J., and Bukh, J. (2008) Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 997-1002.
 186. Gottwein, J. M., Scheel, T. K., Jensen, T. B., Lademann, J. B., Prentoe, J. C., Knudsen, M. L., Hoegh, A. M., and Bukh, J. (2009) Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs, *Hepatology* 49, 364-377.
 187. Bartenschlager, R., and Sparacio, S. (2007) Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture, *Virus research* 127, 195-207.
 188. Steinmann, E., and Pietschmann, T. (2013) Cell culture systems for hepatitis C virus, *Current topics in microbiology and immunology* 369, 17-48.
 189. Lee, N. P., and Luk, J. M. (2010) Hepatic tight junctions: from viral entry to cancer metastasis, *World journal of gastroenterology : WJG* 16, 289-295.
 190. Wang, L., and Boyer, J. L. (2004) The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes, *Hepatology* 39, 892-899.
 191. Shin, K., Fogg, V. C., and Margolis, B. (2006) Tight junctions and cell polarity, *Annual review of cell and developmental biology* 22, 207-235.
 192. Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T., and Bergelson, J. M. (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15191-15196.
 193. Perrault, M., and Pecheur, E. I. (2009) The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership, *The Biochemical journal* 423, 303-314.
 194. Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. A., Bieniasz, P. D., and Rice, C. M. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry, *Nature* 446, 801-805.
 195. Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J. R., Coyne, C. B., and Wang, T. (2009) Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection, *Journal of virology* 83, 2011-2014.

196. Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M., and Dubuisson, J. (1997) Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins, *The Journal of general virology* 78 (Pt 9), 2299-2306.
197. Dahari, H., Feliu, A., Garcia-Retortillo, M., Forn, X., and Neumann, A. U. (2005) Second hepatitis C replication compartment indicated by viral dynamics during liver transplantation, *Journal of hepatology* 42, 491-498.
198. Forton, D. M., Karayiannis, P., Mahmud, N., Taylor-Robinson, S. D., and Thomas, H. C. (2004) Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants, *Journal of virology* 78, 5170-5183.
199. Goutagny, N., Fatmi, A., De Ledinghen, V., Penin, F., Couzigou, P., Inchauspe, G., and Bain, C. (2003) Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection, *The Journal of infectious diseases* 187, 1951-1958.
200. Cormier, E. G., Durso, R. J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W. C., Gardner, J. P., and Dragic, T. (2004) L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14067-14072.
201. Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H. E., and Baumert, T. F. (2003) Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate, *The Journal of biological chemistry* 278, 41003-41012.
202. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., and Zhang, Q. X. (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12766-12771.
203. Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Bartosch, B., Cosset, F. L., Lavillette, D., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Valenzuela-Fernandez, A., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., and Majano, P. L. (2009) The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection, *Journal of virology* 83, 8012-8020.
204. Barth, H., Schnober, E. K., Zhang, F., Linhardt, R. J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F. L., Patel, A. H., Blum, H. E., and Baumert, T. F. (2006) Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction, *Journal of virology* 80, 10579-10590.
205. Andreo, U., Maillard, P., Kalinina, O., Walic, M., Meurs, E., Martinot, M., Marcellin, P., and Budkowska, A. (2007) Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection, *Cellular microbiology* 9, 2445-2456.
206. Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H., and Luo, G. (2012) Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate, *Journal of virology* 86, 7256-7267.
207. Merz, A., Long, G., Hiet, M. S., Brugger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2011) Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome, *The Journal of biological chemistry* 286, 3018-3032.

208. Albecka, A., Belouzard, S., Op de Beeck, A., Descamps, V., Goueslain, L., Bertrand-Michel, J., Terce, F., Duverlie, G., Rouille, Y., and Dubuisson, J. (2012) Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle, *Hepatology* 55, 998-1007.
209. Bartosch, B., Verney, G., Dreux, M., Donot, P., Morice, Y., Penin, F., Pawlotsky, J. M., Lavillette, D., and Cosset, F. L. (2005) An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of infection and protection against neutralizing antibodies, *Journal of virology* 79, 8217-8229.
210. Krieger, M. (2001) Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems, *The Journal of clinical investigation* 108, 793-797.
211. Cocquerel, L., Voisset, C., and Dubuisson, J. (2006) Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions, *The Journal of general virology* 87, 1075-1084.
212. Out, R., Hoekstra, M., Spijkers, J. A., Kruijt, J. K., van Eck, M., Bos, I. S., Twisk, J., and Van Berkel, T. J. (2004) Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice, *Journal of lipid research* 45, 2088-2095.
213. Reynolds, G. M., Harris, H. J., Jennings, A., Hu, K., Grove, J., Lalor, P. F., Adams, D. H., Balfe, P., Hubscher, S. G., and McKeating, J. A. (2008) Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue, *Hepatology* 47, 418-427.
214. Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J., and Vu-Dac, N. (2005) High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I, *The Journal of biological chemistry* 280, 7793-7799.
215. Lavillette, D., Tarr, A. W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., Patel, A. H., Dubuisson, J., Ball, J. K., and Cosset, F. L. (2005) Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus, *Hepatology* 41, 265-274.
216. Grove, J., Huby, T., Stamatakis, Z., Vanwolleghe, T., Meuleman, P., Farquhar, M., Schwarz, A., Moreau, M., Owen, J. S., Leroux-Roels, G., Balfe, P., and McKeating, J. A. (2007) Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity, *Journal of virology* 81, 3162-3169.
217. Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., and Cosset, F. L. (2003) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor, *The Journal of biological chemistry* 278, 41624-41630.
218. Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F. L., Pawlotsky, J. M., Penin, F., and Dubuisson, J. (2005) Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry, *Journal of virology* 79, 15331-15341.
219. von Hahn, T., Lindenbach, B. D., Boullier, A., Quehenberger, O., Paulson, M., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2006) Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells, *Hepatology* 43, 932-942.

220. Kapadia, S. B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J. A., and Chisari, F. V. (2007) Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I, *Journal of virology* 81, 374-383.
221. Levy, S., Todd, S. C., and Maecker, H. T. (1998) CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system, *Annual review of immunology* 16, 89-109.
222. Silvie, O., Rubinstein, E., Boucheix, C., and Mazier, D. (2003) [CD81: a tetraspanin implicated in Plasmodium infection], *Medecine sciences : M/S* 19, 169-171.
223. McKeating, J. A., Zhang, L. Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., Butera, D., Ho, D. D., Dustin, L. B., Rice, C. M., and Balfe, P. (2004) Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner, *Journal of virology* 78, 8496-8505.
224. Aly, H. H., Watashi, K., Hijikata, M., Kaneko, H., Takada, Y., Egawa, H., Uemoto, S., and Shimotohno, K. (2007) Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes, *Journal of hepatology* 46, 26-36.
225. Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2004) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection, *Journal of virology* 78, 1448-1455.
226. Cocquerel, L., Kuo, C. C., Dubuisson, J., and Levy, S. (2003) CD81-dependent binding of hepatitis C virus E1E2 heterodimers, *Journal of virology* 77, 10677-10683.
227. Brazzoli, M., Bianchi, A., Filippini, S., Weiner, A., Zhu, Q., Pizza, M., and Crotta, S. (2008) CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes, *Journal of virology* 82, 8316-8329.
228. Machida, K., Cheng, K. T., Pavio, N., Sung, V. M., and Lai, M. M. (2005) Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells, *Journal of virology* 79, 8079-8089.
229. Van Itallie, C. M., and Anderson, J. M. (2006) Claudins and epithelial paracellular transport, *Annual review of physiology* 68, 403-429.
230. Krieger, S. E., Zeisel, M. B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H. J., Schnober, E. K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., Grunert, F., Dao Thi, V. L., Dreux, M., Cosset, F. L., McKeating, J. A., Schuster, C., and Baumert, T. F. (2010) Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations, *Hepatology* 51, 1144-1157.
231. Furuse, M., and Tsukita, S. (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies, *Trends in cell biology* 16, 181-188.
232. Yang, W., Qiu, C., Biswas, N., Jin, J., Watkins, S. C., Montelaro, R. C., Coyne, C. B., and Wang, T. (2008) Correlation of the tight junction-like distribution of Claudin-1 to the cellular tropism of hepatitis C virus, *The Journal of biological chemistry* 283, 8643-8653.
233. Cukierman, L., Meertens, L., Bertaux, C., Kajumo, F., and Dragic, T. (2009) Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts, *Journal of virology* 83, 5477-5484.
234. Garcia-Calvo, M., Lisnock, J., Bull, H. G., Hawes, B. E., Burnett, D. A., Braun, M. P., Crona, J. H., Davis, H. R., Jr., Dean, D. C., Detmers, P. A., Graziano, M. P.,

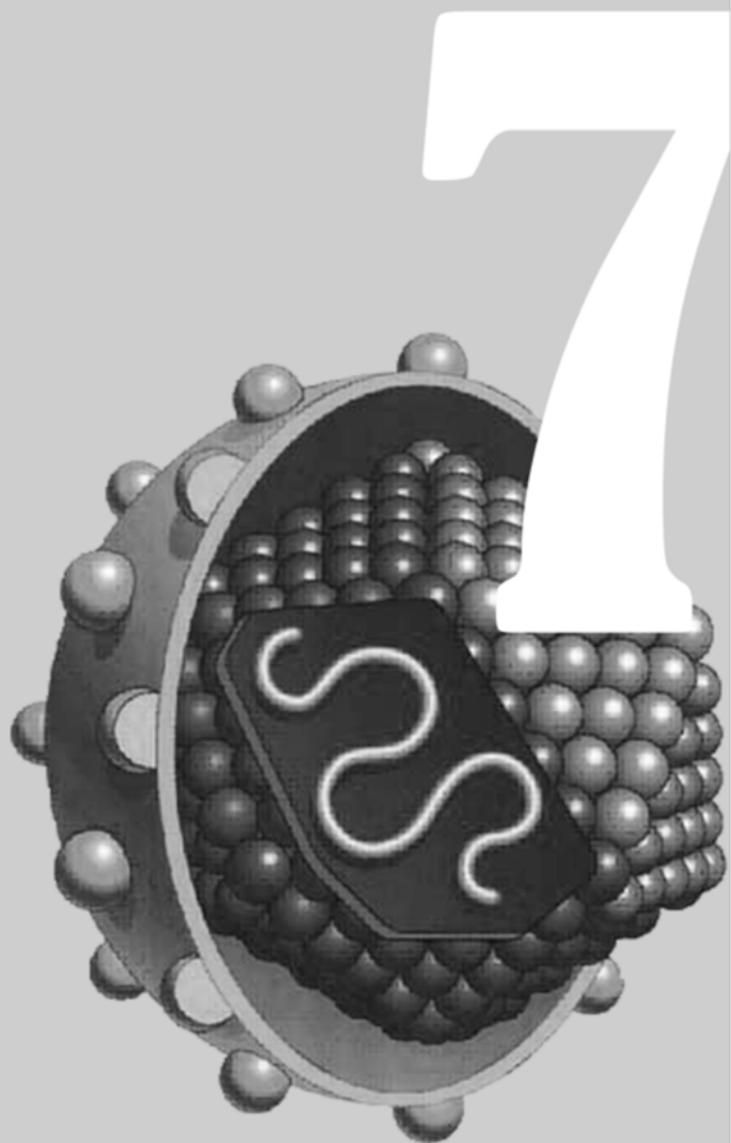
- Hughes, M., Macintyre, D. E., Ogawa, A., O'Neill K, A., Iyer, S. P., Shevell, D. E., Smith, M. M., Tang, Y. S., Makarewicz, A. M., Ujjainwalla, F., Altmann, S. W., Chapman, K. T., and Thornberry, N. A. (2005) The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8132-8137.
235. Temel, R. E., Tang, W., Ma, Y., Rudel, L. L., Willingham, M. C., Ioannou, Y. A., Davies, J. P., Nilsson, L. M., and Yu, L. (2007) Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe, *The Journal of clinical investigation* 117, 1968-1978.
236. Schneider, M. R., and Wolf, E. (2009) The epidermal growth factor receptor ligands at a glance, *Journal of cellular physiology* 218, 460-466.
237. Lackmann, M., and Boyd, A. W. (2008) Eph, a protein family coming of age: more confusion, insight, or complexity?, *Science signaling* 1, re2.
238. Zeisel, M. B., Felmlee, D. J., and Baumert, T. F. (2013) Hepatitis C virus entry, *Current topics in microbiology and immunology* 369, 87-112.
239. Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis, *Journal of virology* 80, 6964-6972.
240. Lyle, J. M., Bullitt, E., Bienz, K., and Kirkegaard, K. (2002) Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices, *Science* 296, 2218-2222.
241. Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., and Bienz, K. (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex, *Journal of virology* 76, 5974-5984.
242. Kaul, A., Stauffer, S., Berger, C., Pertel, T., Schmitt, J., Kallis, S., Zayas, M., Lohmann, V., Luban, J., and Bartenschlager, R. (2009) Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics, *PLoS pathogens* 5, e1000546.
243. Hamamoto, I., Nishimura, Y., Okamoto, T., Aizaki, H., Liu, M., Mori, Y., Abe, T., Suzuki, T., Lai, M. M., Miyamura, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2005) Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B, *Journal of virology* 79, 13473-13482.
244. Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M. J., Miyamura, T., and Brechot, C. (1997) Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1200-1205.
245. Boulant, S., Targett-Adams, P., and McLauchlan, J. (2007) Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus, *The Journal of general virology* 88, 2204-2213.
246. Shavinskaya, A., Boulant, S., Penin, F., McLauchlan, J., and Bartenschlager, R. (2007) The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly, *The Journal of biological chemistry* 282, 37158-37169.
247. Appel, N., Zayas, M., Miller, S., Krijnse-Locker, J., Schaller, T., Friebe, P., Kallis, S., Engel, U., and Bartenschlager, R. (2008) Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly, *PLoS pathogens* 4, e1000035.

248. Counihan, N. A., Rawlinson, S. M., and Lindenbach, B. D. (2011) Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly, *PLoS pathogens* 7, e1002302.
249. Popescu, C. I., Callens, N., Trinel, D., Roingeard, P., Moradpour, D., Descamps, V., Duverlie, G., Penin, F., Heliot, L., Rouille, Y., and Dubuisson, J. (2011) NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly, *PLoS pathogens* 7, e1001278.
250. Yao, Z., Tran, K., and McLeod, R. S. (1997) Intracellular degradation of newly synthesized apolipoprotein B, *Journal of lipid research* 38, 1937-1953.
251. Olofsson, S. O., Bostrom, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., and Boren, J. (2009) Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids, *Biochimica et biophysica acta* 1791, 448-458.
252. Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F. V. (2008) Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion, *Journal of virology* 82, 2120-2129.
253. Lindenbach, B. D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A. J., McKeating, J. A., Lanford, R. E., Feinstone, S. M., Major, M. E., Leroux-Roels, G., and Rice, C. M. (2006) Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3805-3809.
254. Podevin, P., Carpentier, A., Pene, V., Aoudjehane, L., Carriere, M., Zaidi, S., Hernandez, C., Calle, V., Meritet, J. F., Scatton, O., Dreux, M., Cosset, F. L., Wakita, T., Bartenschlager, R., Demignot, S., Conti, F., Rosenberg, A. R., and Calmus, Y. (2010) Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes, *Gastroenterology* 139, 1355-1364.
255. Jiang, J., and Luo, G. (2009) Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles, *Journal of virology* 83, 12680-12691.
256. Collier, K. E., Heaton, N. S., Berger, K. L., Cooper, J. D., Saunders, J. L., and Randall, G. (2012) Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion, *PLoS pathogens* 8, e1002466.
257. Cun, W., Jiang, J., and Luo, G. (2010) The C-terminal alpha-helix domain of apolipoprotein E is required for interaction with nonstructural protein 5A and assembly of hepatitis C virus, *Journal of virology* 84, 11532-11541.
258. Bartenschlager, R., Cosset, F. L., and Lohmann, V. (2010) Hepatitis C virus replication cycle, *Journal of hepatology* 53, 583-585.
259. Sallie, R., Cohen, A. T., Tibbs, C. J., Portmann, B. C., Rayner, A., O'Grady, J. G., Tan, K. C., and Williams, R. (1994) Recurrence of hepatitis C following orthotopic liver transplantation: a polymerase chain reaction and histological study, *Journal of hepatology* 21, 536-542.
260. Ramirez, S., Perez-Del-Pulgar, S., Carrion, J. A., Costa, J., Gonzalez, P., Massaguer, A., Fondevila, C., Garcia-Valdecasas, J. C., Navasa, M., and Forns, X. (2009) Hepatitis C virus compartmentalization and infection recurrence after liver transplantation, *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, 1591-1601.
261. Weissenborn, K., Tryc, A. B., Heeren, M., Worthmann, H., Pflugrad, H., Berding, G., Bokemeyer, M., Tillmann, H. L., and Goldbecker, A. (2009) Hepatitis C virus infection and the brain, *Metabolic brain disease* 24, 197-210.

262. Koutsoudakis, G., Herrmann, E., Kallis, S., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2007) The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells, *Journal of virology* 81, 588-598.
263. Robenek, H., Herwig, J., and Themann, H. (1980) The morphologic characteristics of intercellular junctions between normal human liver cells and cells from patients with extrahepatic cholestasis, *The American journal of pathology* 100, 93-114.
264. Mee, C. J., Farquhar, M. J., Harris, H. J., Hu, K., Ramma, W., Ahmed, A., Maurel, P., Bicknell, R., Balfe, P., and McKeating, J. A. (2010) Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular endothelial growth factor-dependent manner, *Gastroenterology* 138, 1134-1142.
265. Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodriguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M., and Majano, P. L. (2008) Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum, *Hepatology* 48, 1044-1053.
266. Liang, Y., Shilagard, T., Xiao, S. Y., Snyder, N., Lau, D., Cicalese, L., Weiss, H., Vargas, G., and Lemon, S. M. (2009) Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy, *Gastroenterology* 137, 1448-1458.
267. Tarr, A. W., Lafaye, P., Meredith, L., Damier-Piolle, L., Urbanowicz, R. A., Meola, A., Jestin, J. L., Brown, R. J., McKeating, J. A., Rey, F. A., Ball, J. K., and Krey, T. (2013) An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission, *Hepatology* 58, 932-939.
268. Fofana, I., Xiao, F., Thumann, C., Turek, M., Zona, L., Tawar, R. G., Grunert, F., Thompson, J., Zeisel, M. B., and Baumert, T. F. (2013) A novel monoclonal anti-CD81 antibody produced by genetic immunization efficiently inhibits Hepatitis C virus cell-cell transmission, *PLoS one* 8, e64221.
269. Wieland, S., Makowska, Z., Campana, B., Calabrese, D., Dill, M. T., Chung, J., Chisari, F. V., and Heim, M. H. (2013) Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver, *Hepatology*.
270. Kandathil, A. J., Graw, F., Quinn, J., Hwang, H. S., Torbenson, M., Perelson, A. S., Ray, S. C., Thomas, D. L., Ribeiro, R. M., and Balagopal, A. (2013) Use of laser capture microdissection to map hepatitis C virus-positive hepatocytes in human liver, *Gastroenterology* 145, 1404-1413 e1401-1410.
271. Rojo, F., Domingo, L., Sala, M., Zazo, S., Chamizo, C., Menendez, S., Arpi, O., Corominas, J. M., Bragado, R., Servitja, S., Tusquets, I., Nonell, L., Macia, F., Martinez, J., Rovira, A., Albanell, J., and Castells, X. (2014) Gene expression profiling in true interval breast cancer reveals overactivation of the mTOR signaling pathway, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23, 288-299.
272. Dragun, J., Perez-Del-Pulgar, S., Crespo, G., Ramirez, S., Coto-Llerena, M., Mensa, L., Garcia-Valdecasas, J. C., Navasa, M., and Forns, X. (2011) Characterization of the cross-neutralizing antibody response against hepatitis C virus in the liver transplantation setting, *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11, 767-774.

273. Sreekumar, R., Gonzalez-Koch, A., Maor-Kendler, Y., Batts, K., Moreno-Luna, L., Poterucha, J., Burgart, L., Wiesner, R., Kremers, W., Rosen, C., and Charlton, M. R. (2000) Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation, *Hepatology* 32, 1125-1130.
274. Dao Thi, V. L., Granier, C., Zeisel, M. B., Guerin, M., Mancip, J., Granio, O., Penin, F., Lavillette, D., Bartenschlager, R., Baumert, T. F., Cosset, F. L., and Dreux, M. (2012) Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps, *The Journal of biological chemistry* 287, 31242-31257.
275. Zahid, M. N., Turek, M., Xiao, F., Thi, V. L., Guerin, M., Fofana, I., Bachellier, P., Thompson, J., Delang, L., Neyts, J., Bankwitz, D., Pietschmann, T., Dreux, M., Cosset, F. L., Grunert, F., Baumert, T. F., and Zeisel, M. B. (2013) The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination, *Hepatology* 57, 492-504.
276. Schwarz, A. K., Grove, J., Hu, K., Mee, C. J., Balfe, P., and McKeating, J. A. (2009) Hepatoma cell density promotes claudin-1 and scavenger receptor BI expression and hepatitis C virus internalization, *Journal of virology* 83, 12407-12414.
277. Blight, K., Rowland, R., Hall, P. D., Lesniewski, R. R., Trowbridge, R., LaBrooy, J. T., and Gowans, E. J. (1993) Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology, *The American journal of pathology* 143, 1568-1573.
278. Ballardini, G., Groff, P., Giostra, F., Francesconi, R., Miniero, R., Ghetti, S., Zauli, D., and Bianchi, F. B. (1995) Hepatocellular codistribution of c100, c33, c22, and NS5 hepatitis C virus antigens detected by using immunopurified polyclonal spontaneous human antibodies, *Hepatology* 21, 730-734.
279. Agnello, V., Abel, G., Knight, G. B., and Muchmore, E. (1998) Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C, *Hepatology* 28, 573-584.
280. Ballardini, G., De Raffele, E., Groff, P., Bioulac-Sage, P., Grassi, A., Ghetti, S., Susca, M., Strazzabosco, M., Bellusci, R., Iemmolo, R. M., Grazi, G., Zauli, D., Cavallari, A., and Bianchi, F. B. (2002) Timing of reinfection and mechanisms of hepatocellular damage in transplanted hepatitis C virus-reinfected liver, *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 8, 10-20.
281. Shiha, G. E., Zalata, K. R., Abdalla, A. F., and Mohamed, M. K. (2005) Immunohistochemical identification of HCV target antigen in paraffin-embedded liver tissue: reproducibility and staining patterns, *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 25, 254-260.
282. Fenwick, F., Bassendine, M. F., Agarwal, K., Bevitt, D., Pumeechockchai, W., Burt, A. D., and Toms, G. L. (2006) Immunohistochemical assessment of hepatitis C virus antigen in cholestatic hepatitis after liver transplantation, *Journal of clinical pathology* 59, 174-178.
283. Grassi, A., Quarneti, C., Ravaioli, M., Bianchini, F., Susca, M., D'Errico, A., Piscaglia, F., Tame, M. R., Andreone, P., Grazi, G., Galli, S., Zauli, D., Pinna, A.

- D., Bianchi, F. B., and Ballardini, G. (2006) Detection of HCV antigens in liver graft: relevance to the management of recurrent post-liver transplant hepatitis C, *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 12, 1673-1681.
284. Sadamori, H., Yagi, T., Iwagaki, H., Matsuda, H., Shinoura, S., Umeda, Y., Ohara, N., Yanai, H., Ogino, T., and Tanaka, N. (2009) Immunohistochemical staining of liver grafts with a monoclonal antibody against HCV-Envelope 2 for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation, *Journal of gastroenterology and hepatology* 24, 574-580.
285. Pessoa, M. G., Alves, V. A., Wakamatsu, A., Gomes, J. G., Maertens, G., van der Borgh, B., Kim, M., Ferrell, L., and Wright, T. L. (2008) Post-transplant recurrent hepatitis C: immunohistochemical detection of hepatitis C virus core antigen and possible pathogenic implications, *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 28, 807-813.
286. Masuda, Y., Nakazawa, Y., Matsuda, K., Sano, K., Mita, A., Ohno, Y., Urata, K., Ikegami, T., Miwa, S., and Miyagawa, S. (2011) Clinicopathological features of hepatitis C virus disease after living donor liver transplantation: relationship with in situ hybridisation data, *Pathology* 43, 156-160.
287. Negro, F., Giostra, E., Krawczynski, K., Quadri, R., Rubbia-Brandt, L., Mentha, G., Colucci, G., Perrin, L., and Hadengue, A. (1998) Detection of intrahepatic hepatitis C virus replication by strand-specific semi-quantitative RT-PCR: preliminary application to the liver transplantation model, *Journal of hepatology* 29, 1-11.
288. Hughes, M. G., Jr., Rudy, C. K., Chong, T. W., Smith, R. L., Evans, H. L., Iezzoni, J. C., Sawyer, R. G., and Pruett, T. L. (2004) E2 quasispecies specificity of hepatitis C virus association with allografts immediately after liver transplantation, *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 10, 208-216.
289. Portmann, B., Galbraith, R. M., Eddleston, A. L., Zuckerman, A. J., and Williams, R. (1976) Detection of HBSAG in fixed liver tissue - use of a modified immunofluorescent technique and comparison with histochemical methods, *Gut* 17, 1-9.
290. Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., Gentzsch, J., Kaderali, L., Bartenschlager, R., and Pietschmann, T. (2012) MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles, *PLoS pathogens* 8, e1002829.
291. Ciesek, S., Steinmann, E., Iken, M., Ott, M., Helfritz, F. A., Wappler, I., Manns, M. P., Wedemeyer, H., and Pietschmann, T. (2010) Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus, *Gastroenterology* 138, 1875-1884.



ANNEXOS

Article 1

"Hepatitis C virus receptors claudin-1 and occludin after liver transplantation and influence on early viral kinetics"

Laura Mensa*, Gonzalo Crespo*, Matthew J Gastinger, Juraj K Kabat, Sofía Pérez-del-Pulgar, Rosa Miquel, Suzanne U Emerson, Robert H Purcell, Xavier Forns.

Hepatology 2011; 53:1436-1445

Hepatitis C Virus Receptors Claudin-1 and Occludin After Liver Transplantation and Influence on Early Viral Kinetics

Laura Mensa,^{1*} Gonzalo Crespo,^{1*} Matthew J. Gastinger,³ Juraj Kabat,³ Sofía Pérez-del-Pulgar,¹ Rosa Miquel,² Suzanne U. Emerson,⁴ Robert H. Purcell,⁴ and Xavier Forns¹

Liver transplantation (LT) is a unique model to study hepatitis C virus (HCV) entry into hepatocytes. Recent *in vitro* studies suggest significant changes in the expression of the HCV receptors claudin-1 and occludin after HCV infection. Our aims were: (1) to characterize claudin-1 and occludin expression in grafts from LT recipients and (2) to explore their potential influence on early HCV kinetics and their changes after HCV infection. We included 42 HCV-infected LT recipients and 19 uninfected controls. Claudin-1 and occludin were detected in paraffin-embedded liver biopsies obtained during reperfusion and 3 and 12 months after LT. HCV receptors were characterized by confocal immunofluorescence microscopy; quantification and colocalization studies were performed with dedicated software. Claudin-1 and occludin expression were restricted to the apical pole of hepatocytes. There was a significant correlation between the amount of scavenger receptor B1 at the time of reperfusion and the HCV-RNA decay during the first 24 hours following LT ($r = 0.55$, $P = 0.007$). Similarly, there was a significant correlation between the levels of claudin and occludin and the slope of HCV-RNA increase during the first week after LT ($r = 0.63$, $P = 0.005$). Occludin and claudin-1 levels increased significantly 12 months after LT ($P = 0.03$ and $P = 0.007$, respectively). The expression pattern of both proteins, however, remained unchanged, colocalizing strongly (60%-94%) at the apical membrane of hepatocytes. **Conclusions. HCV receptor levels at the time of LT seem to modulate early HCV kinetics. Hepatitis C recurrence after LT was associated with increased levels of claudin-1 and occludin in the hepatocyte cell membrane, although it did not alter their localization within the tight junctions. (HEPATOLOGY 2011;53:1436-1445)**

Hepatitis C virus (HCV) is the leading cause of chronic liver disease in many regions of the world. Chronic hepatitis C progresses to cirrhosis and endstage liver failure in a significant proportion of patients over the years and is the main indication for liver transplantation (LT) in the Western world and Japan.¹ Major advances have been achieved in the last few years towards a better understanding of the HCV life

Abbreviations: CH, cholestatic hepatitis; CMV, cytomegalovirus; CyA, cyclosporine A; DDLT, deceased donor liver transplantation; FFPE, formalin-fixed and paraffin-embedded; FK, tacrolimus; HCV, hepatitis C virus; HCVpp, HCV pseudoparticle; HVP: hepatic venous pressure gradient; LDLT, living donor liver transplantation; LT, liver transplantation; MR, mild hepatitis C recurrence; SR-B1, scavenger receptor B1.

From the ¹Liver Unit, Hospital Clinic, IDIBAPS, Ciberehd, Barcelona, Spain; ²Pathology Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, Ciberehd, Barcelona, Spain; ³Biological Imaging Facility/Research Technologies Branch, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Bethesda, MD; and ⁴Hepatitis Viruses Section, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

Received June 15, 2010; accepted November 29, 2010.

X. Forns received support in part by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI080239), cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF), and by the Spanish Association for the Study of Liver Diseases (AEEH, Beca Hernández-Guío). G. Crespo was supported by Hospital Clinic (Ajut a la Recerca Josep Font) and Fundació BBVA. L. Mensa was supported by Instituto de Salud Carlos III (PFIS). This study was supported in part by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health.

*LM and GC contributed equally to this study and both should be considered first authors.

Address reprint requests to: Xavier Forns, Liver Unit, Institut de Malalties Digestives, Hospital Clinic, IDIBAPS, Ciberehd, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: xforns@clinic.ub.es.

Copyright © 2011 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.24110

Potential conflicts of interest: X.F. received an unrestricted grant support from Schering and Roche. M.G. is currently employed by Bitplane but his affiliation was the one stated above during the period of study design, laboratory work, and article preparation.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

cycle. The development of a retroviral pseudoparticle system (HCVpp)² and the ability of an HCV strain (JFH-1)³ to replicate and release infectious particles in cell culture have been very relevant to the study of HCV entry into hepatocytes. Virus entry is commonly a complex event that requires sequential interactions between viral surface proteins and cellular factors.⁴⁻¹⁰ The exact mechanisms by which HCV reaches the cytoplasm of liver cells and initiates replication are not yet completely understood. The fact that HCV needs several receptors with different membrane distributions favors the hypothesis of a coordinated entry process, such as what occurs with other viruses (i.e., Coxsackie virus B).^{7,10,11} Ploss et al.¹⁰ recently proposed that HCV may initially interact with the luminal (sinusoidal) surface of the hepatocyte by contact with scavenger receptor B1 (SR-B1) and CD81. Thereafter a virus-receptor complex might migrate to the biliary pole (apical membrane), where the virus-receptor complex reaches the tight junctions and uptake into the cytoplasm would occur. The recent discovery that the tight junction proteins claudin-1 and occludin are essential factors for HCV entry into cells suggests a role for these proteins in HCV cell-cell transmission, a route of spread that is still under investigation.⁷

Recent studies have analyzed the potential role of HCV infection in the regulation of its putative receptors, particularly those located in the tight junctions. In one study, HCV infection appeared to down-regulate claudin-1 and occludin in Huh7 cells.¹² In another study, expression of HCV structural proteins in Huh7 cells was not associated with changes in claudin-1 and occludin levels, but these proteins accumulated in the endoplasmic reticulum and their altered localization disrupted the tight junction barrier function.¹³ These differences between studies reflect the complexity of the HCV entry mechanisms and the fact that current *in vitro* systems may not completely reproduce the virus life cycle in a human liver.¹⁴

Liver transplant patients undergo frequent liver biopsies, allowing *in vivo* assessment of the potential changes in the expression of such HCV receptors over time. The aim of this study was to evaluate the potential changes in tight junction proteins claudin-1 and occludin following HCV graft infection and to analyze if their expression could influence early HCV kinetics.

Patients and Methods

Patients. Forty-two HCV-infected patients undergoing LT from January 2000 to January 2008 were included in the study. Selection of patients was based on

the type of hepatitis C recurrence and individuals at both extremes of the disease spectrum (mild and severe) were selected. Mild disease recurrence was defined as absent (F0) or mild (F1) fibrosis 1 year after transplantation, and a normal hepatic venous pressure gradient (HVPG). Severe disease recurrence was defined as the presence of advanced fibrosis ($F \geq 3$) and/or clinically significant portal hypertension (HVPG ≥ 10 mmHg) 1 year after transplantation. Nineteen HCV-negative liver transplant recipients served as controls.^{15,16}

All patients were followed in our Liver Unit and underwent standard immunosuppression protocols.¹⁵ Induction immunosuppression consisted of cyclosporine A or tacrolimus and prednisone. After hospital discharge patients visited the outpatient clinic monthly for 3 months for complete recording of clinical and analytical data and every 2 or 3 months thereafter. Liver biopsies were obtained after graft reperfusion (revascularization of the graft during the surgical procedure) and at 3 and 12 months after LT in accordance with the standard protocol. Patients whose liver disease was likely caused by another reason (rejection, cytomegalovirus [CMV] infection) were excluded. The study was previously approved by the Investigation and Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona following the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. We obtained informed consent from all patients included in the study.

Liver Biopsies. Percutaneous liver biopsies were performed by expert radiologists. HVPG measurements and transjugular liver biopsies were performed at the Hepatic Hemodynamics Laboratory as described.¹⁶ Liver samples were processed by the Pathology Department. All tissue samples were formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE). For diagnostic purposes, samples were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichromic. All histological samples were examined by an expert pathologist (R.M.). Fibrosis stage was scored using the Scheuer classification.

Immunofluorescence Protocols. Representative 5-10 μm sections were cut from paraffin blocks and mounted on charged slides. Slides were heated overnight at 37°C and thereafter deparaffinized by treating the slides with xylene 3 times (10 minutes each) followed by ethanol rehydration.

Antigen retrieval was performed by treating the tissue with heat using a pressure cooker (Pascal, Dako, Carpinteria, CA). When the temperature reached 80°C the sections were placed on metal racks and submerged in a 1 mM EDTA solution (pH 8). The pressure cooker was set to reach 125°C (21 psi) for 2 minutes. Thereafter, the sections were blocked for 30 minutes with phosphate-

buffered saline (PBS) / 10% goat serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), followed by incubation for 2 hours at room temperature with the primary antibody: 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rabbit polyclonal antihuman claudin-1 (Zymed, Invitrogen, Carlsbad, CA), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mouse monoclonal antihuman occludin (Zymed, Invitrogen), 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mouse monoclonal antihuman SR-B1 (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA), or 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rat antihuman CD10 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). After three washes with PBS (10 minutes each), sections were incubated with the secondary antibody for 1 hour at room temperature. Secondary antibodies were: Alexa Fluor 488 goat antirabbit immunoglobulin G (IgG), Alexa Fluor 568 F(ab')₂ fragment of goat antimouse IgG (H+L), and Alexa Fluor 647 goat antirat IgG (Invitrogen). Slides were washed three times with PBS (10 minutes each); after the second wash slides were incubated for 2 minutes with DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Slides were then mounted with Hard Mounting Media (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and kept overnight at room temperature in the dark.

Analysis of Receptor Expression by Confocal Microscopy. Images were acquired on a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Exton, PA) using 488 nm, 561 nm, or 633 nm laser lines. Hoechst dye was excited using a 364 nm Enterprise II UV laser (Coherent, Santa Clara, CA). Sequential frame averaged scans were set up for each fluorophore to eliminate emission crosstalk. All images were saved in a 12 bit TIFF format at 512×512 or 1024×1024 pixels. Surface rendering and colocalization analysis were performed using Imaris (v. 6.2.2, Bitplane, Zurich, Switzerland). For each channel an individual threshold was selected and maintained for all processed samples. Sum of intensities (representing the sum of the intensities obtained in each voxel above the threshold) and number of positive voxels (those with intensity above the established threshold) were calculated for each individual sample. In order to correctly sample the entire liver biopsy, 10 different image acquisitions were obtained for each liver section. The sum of intensities and the number of positive voxels for each biopsy was calculated as the geometrical mean of the individual values obtained in the different acquisitions.

A detailed colocalization study for claudin-1 and occludin was performed in 20 selected specimens. For this purpose, triple staining was carried out with rabbit anti-claudin-1, mouse anti-occludin, and rat anti-CD10 (a commonly used marker of the biliary canalicula). Sequential sections of stained samples were acquired with the 63 \times -oil immersion objective (NA 1.4) at a zoom of 5 to 7 with a Z-step of

0.20-0.25 μm through the entire volume of the paraffin section (≈ 7 -10 μm section thickness). All collected images for 3D analyses were deconvolved by Huygens Essential software (v. 3.4, Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands). A 3D image volume was reconstructed from sequential z-sections and colocalization analyses were performed in Imaris software. Surface rendering and channel masking was used in conjunction with manual thresholding to calculate protein colocalization statistics in a 3D environment. The same level of thresholding was applied to each dataset; unlabeled regions were not included in this analysis (masking). The level of colocalization in the 3D volume was measured as percent of volume of the channel above threshold colocalized (the total number of colocalized voxels divided by the total number of voxels in each channel that are above the threshold). A second measure of the intensity of colocalization between claudin-1 and occludin was obtained by calculating the correlation between the intensities of the colocalized voxels (Pearson correlation).

Positive (strongly positive samples) and negative controls (samples stained with an irrelevant primary antibody) were included in each experiment. In order to ensure that differences in the expression of receptors were not due to methodological issues, 20 random liver biopsies were processed in triplicate on different days following the same protocols. Sum of intensities for SR-B1 and claudin-1 as well as the number of positive voxels for each channel were compared for each independent experiment. Samples were always processed blindly. This applied both to the immunofluorescence protocol and for image processing. Coding of slides allowed the staining of samples belonging to the same patient in the same experiment.

Quantitation of Claudin-1 and Occludin Messenger RNA (mRNA) by Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). Total RNA was extracted from 5 μm FFPE liver sections (five sections for each sample) using the RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then stored at -80°C in 66 available samples. Reverse transcription was performed with the Archive High Capacity complementary DNA (cDNA) Synthesis Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Levels of claudin-1 and occludin were measured with TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Ribosomal protein L13a (RPL13a) was chosen as an endogenous control for mRNA normalization. Relative quantitation was carried out using the standard curve method. Data are expressed as the fold change relative to an arbitrary calibrator.

Table 1. Baseline Characteristics of Patients Included in the Study

	Controls n=19	HCV-Infected Patients n=42	P	HCV-Infected Patients n=42		P
				Mild Recurrence n=23	Severe Recurrence n=19	
Age (years)	58 (42-68)	57 (36-69)	0.51	55 (39-66)	62 (36-69)	0.22
Sex, males (%)	15 (79)	22 (52)	0.09	13 (57)	9 (47)	0.8
Donor age (years)	47 (25-76)	45 (13-77)	0.59	34 (13-76)	53 (18-77)	0.005
Ischemia time (min)	458 (275-900)	342 (60-720)	0.007	322 (60-720)	362 (85-485)	0.5
Genotype (%)						
1		37 (88)		20 (87)	17 (90)	0.3
2/3		3 (7)		2 (9)	1 (5)	
Unknown		2 (5)		1 (4)	1 (5)	
Pre-LT viral load (log ₁₀ IU/mL)		5 (2-6.6)		4.5 (2-6.6)	5.32 (2.9-6.56)	0.47
Viral load 1 month (log ₁₀ IU/mL)		6.4 (4-7.03)		5.9 (4.9-7.8)	6.8 (4.7-9)	0.03
Viral load 3 month (log ₁₀ IU/mL)		6.6 (4.7-8.5)		6.2 (4.7-7.9)	6.7 (5.8-8.5)	0.02
Viral load 12 month (log ₁₀ IU/mL)*		6.3 (3.9-7.5)		6.3 (4-7)	6.3 (3.9-7.5)	0.32†
Type of transplantation DDLT vs. LDLT	15 (79)/4 (21)	37 (88)/5 (12)	0.44	21 (91)/2 (9)	16 (84)/ 3 (16)	0.6
Immunosuppression						
CyA	6 (32)	23 (55)	0.4	13 (57)	10 (53)	1
FK	13 (68)	19 (45)		10 (43)	9 (47)	
Acute rejection	8 (42)	11 (26)	0.24	7 (30)	4 (21)	0.49
Corticosteroid bolus	3 (16)	7 (17)	1	5 (28)	2 (11)	0.33
CMV disease‡	0	5 (12)	0.14	2 (9)	3 (16)	0.48
Biliary complications	3 (16)	14 (33)	0.22	7 (30)	7 (37)	0.75
Fibrosis stage (1y)						
F0		16 (38)		16 (70)	–	
F1		7 (17)		7 (30)	–	
F3		13 (31)		–	13 (68)	
F4		5 (12)		–	5 (26)	
HVPG (1 y)§						
<6 mmHg		21 (52)		21	–	
≥10 mmHg		19 (48)		–	19	

Abbreviations: DDLT: deceased donor liver transplantation; LDLT: living donor liver transplantation; CyA; cyclosporine A; FK: tacrolimus, CMV: cytomegalovirus; y: year.

*There were no differences in viral load between patients treated with CyA and FK at any timepoint.

†Patients who were under antiviral treatment are excluded.

‡Detection of CMV (antigen, DNA) in the presence of symptoms.

§Available in 40 patients.

HCV-RNA Determination. To study early HCV kinetics, serum samples were obtained immediately before LT and daily during the first week following LT. Thereafter, samples were collected weekly during the first month and at months 3, 6, and 12. Viral load in serum specimens was determined by real-time PCR (m2000rt, Abbott, with a detection limit of 30 IU/mL), as reported.¹⁵ Samples belonging to the same patient were assayed in the same run.

Statistical Analysis. Quantitative variables are expressed as medians (range) and depicted in the figures as boxplots. Differences between qualitative variables were assessed with the Fisher exact test. Differences between quantitative variables were analyzed with a nonparametric test (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis for unpaired samples, Wilcoxon for paired samples). Correlations between quantitative variables were expressed by the Pearson coefficient. The software used for statistical analysis was SPSS 16.0 (Chicago IL).

Results

Patient Characteristics. Forty-two HCV-infected patients and 19 HCV-negative controls were included in the study. The baseline characteristics of the patients are summarized in Table 1. Hepatitis C recurrence was mild in 23 individuals and severe in 19. A liver biopsy obtained at time of liver reperfusion and 12 months after LT was available for all 42 patients; a 3-month biopsy was available in 36. For the 19 HCV-negative controls, liver biopsies were available for all individuals at the three timepoints. The indication for LT in the controls was alcoholic cirrhosis (14), hepatitis B (1), primary sclerosing cholangitis (1), NASH (2), and familiar amyloidotic polyneuropathy (1).

Quantitative Expression of HCV Receptors: Reproducibility. Twenty random liver biopsies were stained for claudin-1 and SR-B1 in three independent experiments using slices from the same biopsy. For claudin-1 the correlation coefficients between the sum of intensities obtained in the three independent

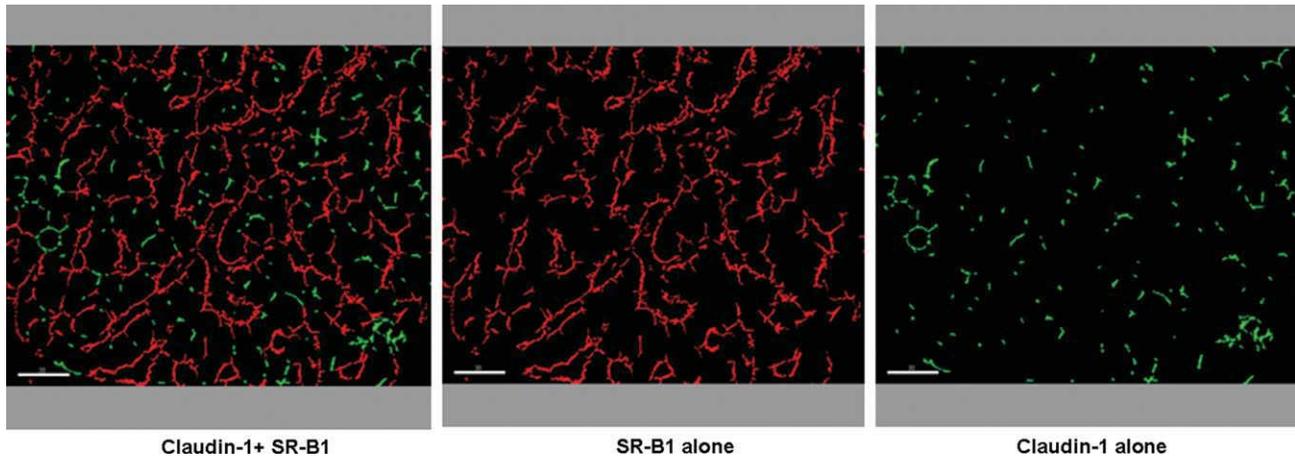


Fig. 1. Immunostaining of claudin-1 and SR-B1 in a representative liver biopsy. Claudin-1 is depicted in green, SR-B1 is shown in red. The expression of claudin-1 is restricted to the apical membrane of the hepatocytes, whereas SR-B1 is expressed in the sinusoidal pole of liver cells.

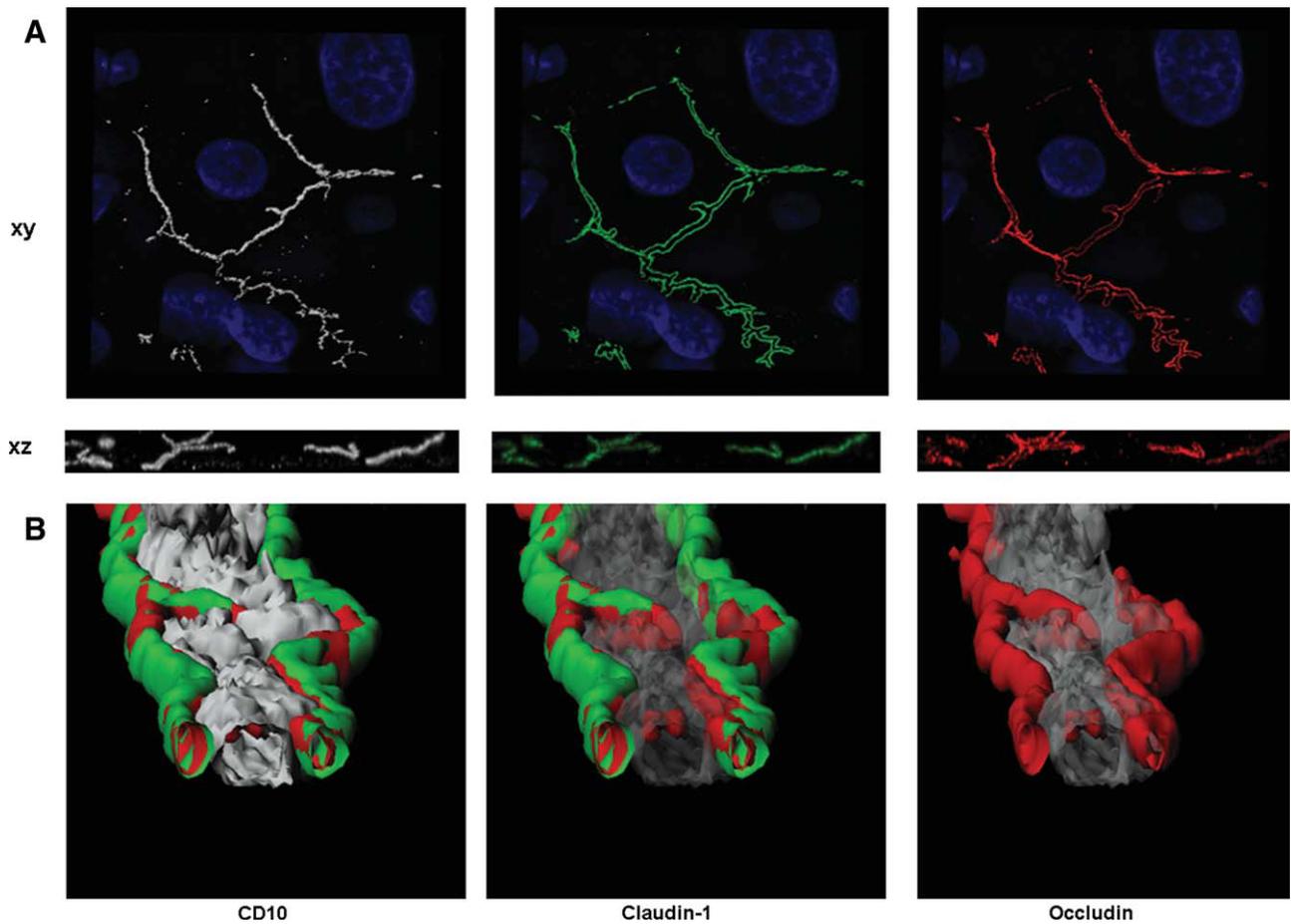


Fig. 2. (A) Confocal images (xy and xz sections) obtained from a liver biopsy of an HCV-infected patient. Claudin-1 (green) and occludin (red) localization is restricted to the apical membrane of hepatocytes following a typical tram track (tight junction) pattern; CD10 (a biliary canalicular marker) is depicted in white. (B) High-resolution 3D image. CD10 (white) localized within the bile canaliculi, which is most likely explained by its expression in the microvilli of adjacent hepatocytes. Claudin-1 (green) and occludin (red) distribution followed the apical membrane of adjacent hepatocytes.

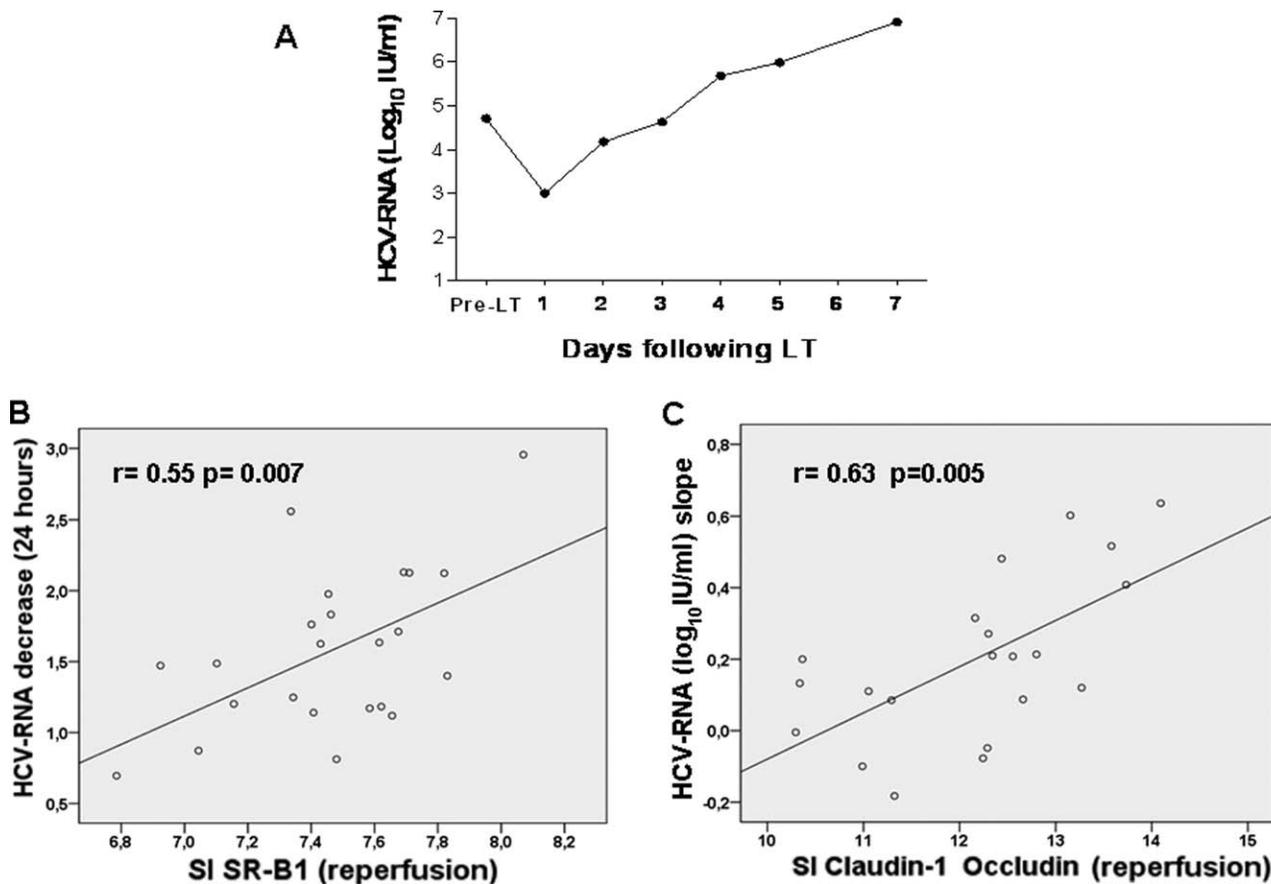


Fig. 3. Influence of HCV receptor abundance and early viral kinetics. (A) HCV early viral kinetics in a representative patient: HCV-RNA concentration is depicted on the y axis (logarithmic scale, IU/mL) and time (in hours) is shown on the x axis. (B) Correlation between SR-B1 levels in the graft and the HCV-RNA decline (in log₁₀) during the first 24 hours after LT. (C) Correlation between the abundance of claudin-1 and occludin in the graft and the HCV-RNA increase slope during the first 7 days following LT. Levels of SR-B1, claudin-1, and occludin are represented as the sum of intensities (x axis log₁₀). SI: sum of intensities.

experiments ranged from 0.72 to 0.75 ($P < 0.01$ in all cases). For SR-B1 the comparable values ranged from 0.89 to 0.91 ($P < 0.01$ in all cases). These data support the excellent reproducibility of receptor quantification using our methodology.

Localization of HCV Receptors Claudin-1 and Occludin in Hepatocytes. Immunostaining of claudin-1 and occludin in liver biopsies demonstrated the expression of both tight junction proteins in the apical membrane of the hepatocytes, whereas SR-B1 was expressed in the sinusoidal pole of liver cells (Fig. 1). To confirm that expression of claudin-1 and occludin was restricted to the apical pole of hepatocytes, we performed a triple staining, including CD10 in 20 representative samples. CD10, also known as common ALL antigen (CALLA) is a cell membrane metalloproteinase that is expressed in the canaliculi of normal or neoplastic liver. As shown in Fig. 2A, claudin-1, occludin, and CD10 were localized in the apical pole of hepatocytes. We were unable to detect significant amounts of claudin-1 and occludin in the basolateral/

sinusoidal membrane of liver cells in any of the studied samples. High-resolution 3D images were obtained in the 20 selected liver biopsies. As shown in Fig. 2B, CD10 was localized within the biliary canalicula, which is most likely explained by its distribution along the surface of the microvilli of the liver cells.¹⁷ Claudin-1 and occludin distribution followed the apical membrane of adjacent hepatocytes, corresponding to proteins localized in tight junctions.

We also used the high-resolution images to study the colocalization pattern of the two HCV receptors. Our results indicate that overall, claudin-1 and occludin colocalized strongly in all studied samples: 60% to 94% of claudin-1 volume colocalized with occludin. The coefficients of correlation between colocalized voxels, however, varied significantly from sample to sample and ranged from 0.20 to 0.86 and correlated strongly with the amount of expressed claudin-1 ($r = 0.8$, $P < 0.001$).

Viral Kinetics and Receptor Expression. We wished to determine if SR-B1 and tight junction

proteins claudin-1 and occludin (which most likely represent the final step in HCV entry into hepatocytes) influenced early HCV kinetics. For this purpose, we divided early viral kinetics into two different components: (1) the initial viral load decay, which occurs during the first 24 hours following graft reperfusion and (2) the viral load increase the first week following LT (Fig. 3A).¹⁸ The first viral load decline may represent massive viral uptake by the liver, whereas the viral load increase during the first week indicates HCV replication in the newly infected liver. There was a significant correlation between the viral load decay and the levels of SR-B1 in the graft at the time of reperfusion ($r = 0.55$, $P = 0.007$) (Fig. 3B). Interestingly, there was a significant relationship between the levels of occludin and claudin-1 in the graft at the time of reperfusion and the slope of HCV-RNA increase during the first week after LT ($r = 0.63$; $P = 0.005$) (Fig. 3C), suggesting a potential role of these receptors in regulating early HCV kinetics.

Changes of Claudin-1 and Occludin Expression Levels and Pattern Following HCV Infection. We analyzed if the expression pattern of these proteins changed following HCV infection after LT. For this purpose we compared the patterns of claudin-1 and occludin expression in liver samples obtained during graft reperfusion (before HCV replication starts in the liver) and at 3 and 12 months after LT. Localization of claudin-1 and occludin was limited to the apical pole of the hepatocyte membrane at all timepoints, independently of the severity of hepatitis C recurrence (Fig. 4A,B). Reconstruction of 3D images in xz sections supported the absence of significant amounts of these proteins in the basolateral/sinusoidal membrane of the hepatocytes. Moreover, we did not observe cytoplasmic retention of claudin-1 or occludin after HCV infection, as described *in vitro*.¹⁹ We observed a significant increase in the levels of occludin and claudin-1 1 year after LT ($P = 0.03$ and $P = 0.007$, respectively), both in patients with mild and severe disease recurrence (Supporting Table 1 and Supporting Fig. 1). In the HCV-negative controls the levels of claudin-1 and occludin remained unchanged after transplantation (Supporting Fig. 1).

The amount of claudin-1 was higher in liver samples from patients with severe hepatitis C recurrence (particularly 12 months after LT) compared to those with mild recurrence, but the differences did not reach statistical significance (Supporting Table 1). Interestingly, in the subgroup of patients with severe cholestatic hepatitis ($n = 12$) the amount of claudin-1 12 months after LT was significantly higher

compared to the remaining patients ($P = 0.005$) (Fig. 5). Claudin-1 levels did not correlate with any of the biochemical markers of cholestasis (gamma glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, bilirubin) or HCV-RNA concentration obtained at the same timepoints.

With regard to mRNA quantification, we found no correlation between mRNA and protein abundance levels (as quantified by confocal microscopy) either for claudin-1 ($r = 0.2$, not significant [ns]) or for occludin ($r = 0.1$, ns). Indeed, claudin-1 mRNA levels remained stable over time in HCV-infected patients; occludin mRNA levels increased, although the difference did not reach statistical significance (Supporting Fig. 1). Similarly, we did not detect significant differences in the mRNA levels of these two proteins in individuals with mild or severe disease recurrence.

Discussion

HCV entry is a complex process involving several receptors. It is believed that HCV particles are consecutively bound by a complex formed by SR-B1 and CD81. Virus associated with CD81 would then be transferred into tight junctions, where HCV would interact with claudin-1 and occludin to enter the cell by clathrin-dependent endocytosis.⁴⁻¹⁰ Another hypothesis suggests that internalization of HCV is not limited to tight junctions and that the virus might use claudin-CD81 complexes in the basolateral surface of hepatocytes to enter into the cell.²⁰ Tight junctions are multiprotein complexes that seal the space between adjacent cells. In fact, hepatocyte plasma membranes are separated by tight junctions into sinusoidal-basolateral and apical domains.²¹ These two domains are very important for hepatocytes to perform diverse functions, such as canalicular bile secretion and simultaneous sinusoidal secretion of serum proteins into blood.

Because the tight-junction proteins claudin-1 and occludin are thought to be a relevant part of HCV entry into hepatocytes, our goal was to characterize (1) the expression pattern of these proteins in liver tissue of patients undergoing LT, (2) their influence on early HCV kinetics following recurrent hepatitis C and their potential changes following HCV infection of the graft.

We used the LT model for several reasons: (1) tissue samples can be obtained before and after HCV infection; (2) infection can be monitored from the beginning and thus, it is possible to obtain data on early HCV kinetics; (3) hepatitis C recurrence after LT is a

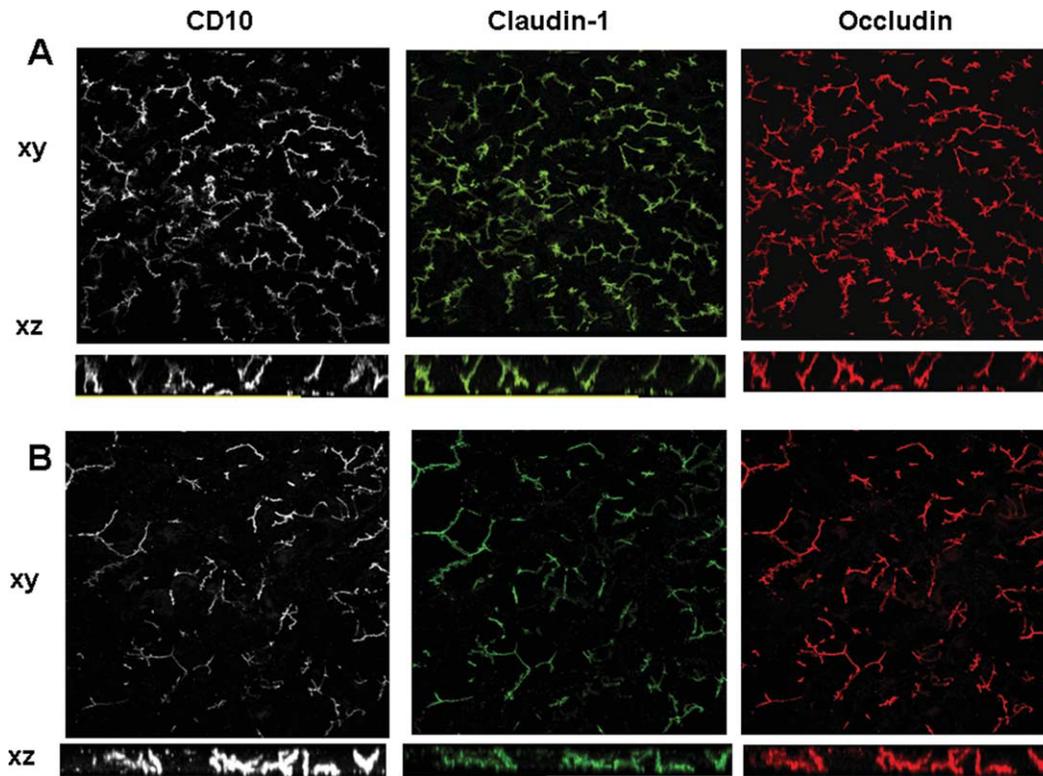


Fig. 4. Confocal xy and xz sections of liver biopsies from a representative patient with severe hepatitis C recurrence. Immunostaining was performed with CD10, claudin-1, and occludin. We did not find significant differences in the staining pattern of the three proteins when comparing samples obtained at time of reperfusion (A) and 3 months after transplantation (B). Claudin-1 and occludin staining was restricted to the apical pole of hepatocytes with no abnormal retention in the cell cytoplasm.

rapidly progressive disease and patients with mild or very severe hepatitis recurrence can be well characterized; (4) finally, expression of HCV receptors has not been characterized in this model so far.

Several reports based on *in vitro* experiments have suggested major changes in the expression of these proteins after HCV infection of liver cells. Using the replicon system Benedicto et al.¹³ explored the effect of HCV on

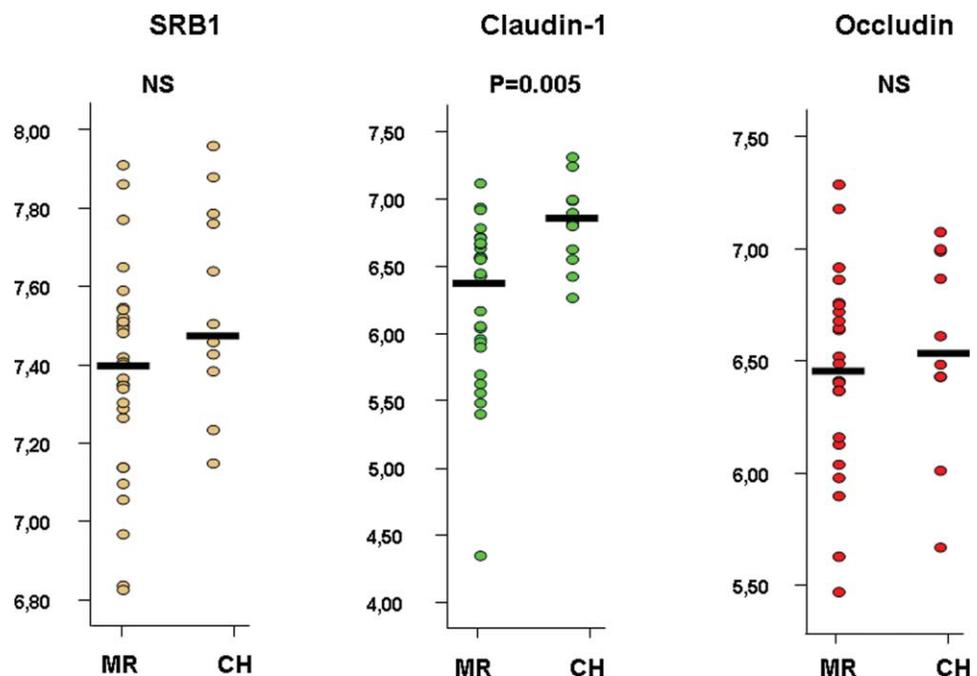


Fig. 5. Sum of intensities of SRB1, occludin, and claudin-1 1 year after transplantation in patients with mild hepatitis C recurrence (MR) and cholestatic hepatitis (CH). Median values are depicted as a line.

tight junction organization, demonstrating that in Huh7 cells containing a genomic replicon, occludin and claudin-1 accumulated in the cytoplasm of the cells as dot-like structures (and were not detected in the tight junction). Colocalization studies suggested that the envelope protein E2 could play a role in the mislocalization of tight junction-associated proteins. Our results show that, *in vivo*, HCV infection is not associated with retention of claudin-1 and occludin in the cytoplasm of hepatocytes. We found that claudin-1 and occludin remained in the apical pole of hepatocytes even in cases with severe cholestatic hepatitis. In the latter cases, the only structural change observed was a slight dilation of the biliary canaliculi. The absence of mislocalized claudin-1 and occludin was verified by using additional antibodies directed to distinct protein epitopes (data not shown). A potential limitation of our findings is the possibility that only a small proportion of hepatocytes are infected with HCV and, thus, that morphological changes are restricted to areas of infected cells.²² Nevertheless, we analyzed a large number of liver cells per biopsy (>3,000). Moreover, changes in tight junction proteins affecting a very small proportion of hepatocytes would not explain the significant clinical expression (cholestasis) found in hepatitis C recurrence. Because tight junctions are multiprotein complexes highly regulated by cytokines and interleukins,^{23,24} we cannot exclude that alterations in permeability or function may be explained by changes in protein composition during a strong inflammatory event such as hepatitis C.

Despite the absence of structural changes in the tight junctions, we observed an increased expression of claudin-1 and occludin over time in HCV-infected patients. The increase in claudin-1 was particularly significant in individuals with cholestatic hepatitis. Enhanced apical expression of claudin-1 and occludin after HCV infection could represent a mechanism favoring cell-to-cell transmission of HCV within the liver.⁷ We did not find a correlation between claudin-1 and occludin mRNA and protein levels, although the association between levels of RNA and protein products can vary greatly.^{25,26} What our results may indicate is that HCV proteins influence claudin-1 and occludin expression either by affecting them at a posttranscriptional level or by altering the complex membrane traffic of tight-junction proteins. These proteins are recycled by way of various mechanisms such as by clathrin-mediated and caveolae-mediated endocytosis, as well as by macropinocytosis; these pathways may be altered by HCV infection, particularly in cases with high HCV replication. Our data, however, are based on a small number of samples and, more important, do not allow for a functional analysis of tight junctions. Thus, we must be cautious with our conclusions.

Up to a certain extent, our findings are in agreement with Reynolds et al.,²⁷ who reported a significant increase in claudin-1 expression after infecting Huh7 cells with HCVcc. The latter was also observed in tissue from HCV-infected patients as compared to samples from uninfected livers, with focal regions of basolaterally expressed claudin-1. The increase in both HCV receptors found in our study was not attributable, however, to the presence of claudin-1 or occludin in the basolateral/sinusoidal membrane, but rather to an increased presence of these proteins in the apical membrane of hepatocytes. We showed that claudin-1 and occludin localization followed a similar pattern to that of CD10 and confirmed the findings in high resolution images. The discrepancies between our results and those by Reynolds et al. may be explained by the different methodology (we used imaging software that allowed precise and reproducible quantification of these proteins) and the different patient population (they used livers from patients with end-stage cirrhosis).

We studied early HCV kinetics by assessing daily HCV-RNA concentrations in a subgroup of patients. Because SR-B1 may be the first putative HCV receptor which contacts the virus, we explored if its levels of expression at the time of LT influenced the initial viral decay immediately following graft reperfusion. *In vitro*, SR-B1 surface expression has been reported to affect HCV infection: SR-B1 overexpression enhances HCV internalization whereas SR-B1 silencing reduces infectivity of cell culture-produced HCV (HCVcc) and HCVpp.²⁸⁻³⁰ We found a significant correlation between the levels of expression of SR-B1 in the graft (at the time of LT) and the magnitude of the viral decrease (during the first 24 hours following transplantation). This supports a massive uptake of HCV by the liver immediately after graft reperfusion. It is obvious that other variables may play a role in early viral decay, such as the amount of blood loss or transfusion requirements during the surgical procedure.¹⁸ We were particularly interested in exploring the potential effect of claudin-1 and occludin expression in early HCV kinetics after graft reperfusion. We observed that the viral load increase slope during the first 7 days following graft reperfusion was significantly greater in the patients with high claudin-1 and occludin levels, showing a significant correlation between their expression in the graft and the slope of viral increase. Timpe et al.³¹ recently suggested that HCV can be transmitted directly between cells, most likely using the HCV receptors found in tight junctions. Data obtained after visualization of HCV antigens in human livers by two-photon microscopy indicate that infected hepatocytes are found

in clusters, further supporting the spread of HCV from cell to cell.²² Our results would also suggest a role of cell-to-cell transmission during the first days following graft infection: the presence of high levels of claudin-1 and occludin might facilitate HCV spread within the liver, resulting in a faster increase in HCV-RNA concentrations. It is clear that other variables not analyzed in this study (such as HCV fitness, quasispecies evolution) may also play a role in early HCV kinetics.

Our study has some limitations. First, the study is retrospective in its design and preservation of liver samples may not have been completely homogeneous across the study period. Second, liver tissue obtained before HCV infection (reperfusion liver biopsies) cannot be considered normal, because samples are obtained from the liver of a deceased donor after treatment of the organ with a preservation solution. Finally, patients undergoing LT are treated with immunosuppression drugs, which may influence the expression of HCV receptors.

In summary, hepatitis C recurrence after LT is associated with increased levels of claudin-1 and occludin in hepatocyte membranes, although this does not alter their localization or expression pattern within the tight junctions. HCV receptor levels at the time of LT seem to modulate early HCV kinetics, which may be relevant when designing strategies to prevent HCV infection in the graft.

References

- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *HEPATOLOGY* 2009;49:1335-1374.
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003;197:633-642.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
- Bartosch B, Vitelli A, Granier C, Goujon C, Dubuisson J, Pascale S, et al. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem* 2003;278:41624-41630.
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002;21:5017-5025.
- Zeisel MB, Koutsoudakis G, Schnober EK, Haberstroh A, Blum HE, Cosset FL, et al. Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81. *HEPATOLOGY* 2007;46:1722-1731.
- Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 2009;90:1055-1070.
- Evans MJ, Rice CM. Hepatitis C virus replicons finally get to second base. *Gastroenterology* 2003;125:1892-1895.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941.
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009;457:882-886.
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherné DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 2007;446:801-805.
- Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 2009;83:2011-2014.
- Benedicto I, Molina-Jimenez F, Barreiro O, Maldonado-Rodriguez A, Prieto J, Moreno-Otero R, et al. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *HEPATOLOGY* 2008;48:1044-1053.
- Decaens C, Durand M, Grosse B, Cassio D. Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol Cell* 2008;100:387-398.
- Carrion JA, Navasa M, Garcia-Retortillo M, Garcia-Pagan JC, Crespo G, Bruguera M, et al. Efficacy of antiviral therapy on hepatitis C recurrence after liver transplantation: a randomized controlled study. *Gastroenterology* 2007;132:1746-1756.
- Blasco A, Forns X, Carrion JA, Garcia-Pagan JC, Gilibert R, Rimola A, et al. Hepatic venous pressure gradient identifies patients at risk of severe hepatitis C recurrence after liver transplantation. *HEPATOLOGY* 2006;43:492-499.
- Loke SL, Leung CY, Chiu KY, Yau WL, Cheung KN, Ma L. Localisation of CD10 to biliary canaliculi by immunoelectron microscopical examination. *J Clin Pathol* 1990;43:654-656.
- Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, et al. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *HEPATOLOGY* 2002;35:680-687.
- Benedicto I, Molina-Jimenez F, Bartosch B, Cosset FL, Lavillette D, Prieto J, et al. The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J Virol* 2009;83:8012-8020.
- Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ, et al. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 2010;285:21092-21102.
- Wang L, Boyer JL. The maintenance and generation of membrane polarity in hepatocytes. *HEPATOLOGY* 2004;39:892-899.
- Liang Y, Shilagard T, Xiao SY, Snyder N, Lau D, Cicalese L, et al. Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology* 2009;137:1448-1458.
- Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Chiba H, Kokai Y, Sawada N. Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Med Electron Microsc* 2003;36:157-164.
- Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:864-871.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:304-313.
- Gry M, Rimini R, Stromberg S, Asplund A, Ponten F, Uhlen M, et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics* 2009;10:365-79.
- Reynolds GM, Harris HJ, Jennings A, Hu K, Grove J, Lalor PF, et al. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. *HEPATOLOGY* 2008; 47:418-27.
- Grove J, Huby T, Stamataki Z, Vanwolleghem T, Meuleman P, Farquhar M, et al. Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *J Virol* 2007;81:3162-3169.
- Schwarz AK, Grove J, Hu K, Mee CJ, Balfe P, McKeating JA. Hepatoma cell density promotes claudin-1 and scavenger receptor BI expression and hepatitis C virus internalization. *J Virol* 2009;83:12407-12414.
- Ciesek S, Steinmann E, Iken M, Ott M, Helfritz FA, Wappler I, et al. Glucocorticosteroids increase cell entry by hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010;138:1875-1884.
- Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *HEPATOLOGY* 2008;47:17-24.

Article 2

"Imaging of hepatitis C virus infection in liver grafts after liver transplantation"

Laura Mensa*, Sofía Pérez-del-Pulgar, Gonzalo Crespo, George Koutsoudakis, Carlos Fernández-Carrillo, Mairene Coto-Llerena, Rosa Miquel, Helena Allende, Lluís Castells, Miquel Navasa, Xavier Forns.

Journal of Hepatology 2013; 59:271-278

Imaging of hepatitis C virus infection in liver grafts after liver transplantation

Laura Mensa¹, Sofía Pérez-del-Pulgar^{1,*}, Gonzalo Crespo¹, George Koutsoudakis¹, Carlos Fernández-Carrillo¹, Mairene Coto-Llerena¹, Rosa Miquel², Helena Allende³, Lluís Castells⁴, Miquel Navasa¹, Xavier Forns¹

¹Liver Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Barcelona, Spain; ²Pathology Department, Hospital Clínic, Barcelona, Spain;

³Pathology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain;

⁴Liver Unit, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERehd, Barcelona, Spain

Background & Aims: The detection of native hepatitis C virus (HCV) antigens in liver tissue may be relevant to diagnostic purposes and to better understand the pathogenesis of HCV infection. The aim of our study was to characterize HCV antigens in liver grafts.

Methods: We selected 32 liver transplant (LT) recipients with recurrent hepatitis C. HCV core and NS5A antigens were detected in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) liver biopsies obtained immediately after graft reperfusion (negative controls), during the acute phase of HCV infection (1–6 months) and during follow-up (7–74 months) after LT. Viral antigens were assessed by immunohistochemistry and confocal microscopy.

Results: All reperfusion biopsies were negative for both antigens. Core protein was detected in 75% and 33% of acute phase and follow-up biopsies, respectively. HCV antigens were not detected in any of the 10 samples from patients who cleared HCV after anti-viral treatment. Immunostaining was hepatocellular, with a granular cytoplasmic pattern and a wide spectrum of intensity. We found a significant association between viral load and the presence of HCV core-positive hepatocytes ($p = 0.004$). NS5A colocalized strongly with core (66%) and adipophilin (36%), supporting the localization of core and NS5A around lipid droplets. A detailed three-dimensional analysis showed that NS5A surrounded the core and adipophilin-positive areas.

Conclusions: HCV antigens can be detected in FFPE liver biopsies by immunohistochemistry. The *in vivo* colocalization of core and NS5A proteins around the lipid droplets supports that the latter may play a role in virus particle production, similar to what reported *in vitro*.

Keywords: Hepatitis C virus; Liver transplantation; HCV antigen detection; Confocal microscopy.

Received 3 October 2012; received in revised form 13 March 2013; accepted 17 March 2013; available online 30 March 2013

* Corresponding author. Address: Hospital Clínic, IDIBAPS, CIBERehd, Rosellón 149, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x2093; fax: +34 933129405.

E-mail address: sofiaapp@clinic.ub.es (S. Pérez-del-Pulgar).

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; LT, liver transplantation; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; 3D, three-dimensional; SVR, sustained virological response; ROI, region of interest; VOOD, venous outflow obstruction disease; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

© 2013 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

End-stage liver disease due to chronic hepatitis C virus (HCV) infection is the leading indication for liver transplantation (LT) in the Americas, Europe, and Japan. Graft infection is universal in patients with a detectable viral load at the time of LT, and persistent infection leading to chronic hepatitis, cirrhosis, and graft failure occurs in a significant proportion of patients [1–3]. The histopathological diagnosis of recurrent hepatitis C during the first months after LT is straightforward when typical lesions of HCV infection are present in the biopsy. However, in some particular cases with atypical HCV-related histopathologic findings, the differential diagnosis may be a challenge for the pathologist, mainly with drug-induced injury, biliary pathology or acute cellular rejection.

The immunohistochemical detection of HCV antigens in liver biopsies may be helpful for the diagnosis and clinical management of patients with HCV infection. In addition, it could potentially provide important information regarding the life cycle of the virus and the host response, including the localization of the virus and the relationship between sites of viral replication and tissue injury. To date, however, the proportion and distribution of HCV-infected hepatocytes remain unclear. This is probably due to the low expression of viral antigens within the liver and to the fact that HCV antigen detection by immunostaining often yields inconsistent results, reflecting disparities in the methods and reagents employed [4–8].

In this study, we have analyzed the presence of HCV antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) liver biopsy specimens from LT recipients with recurrent hepatitis C. We have used the LT model because tissue samples can be obtained both before and after HCV infection. On the one hand, reperfusion biopsies can be used as negative controls since they are obtained immediately after revascularization of the graft during surgery (before



Research Article

replication starts within the liver). On the other hand, the viral load peaks during the first months after LT (acute hepatitis phase), most likely due to strong immunosuppression regimens. This may increase the chance of detecting HCV antigens within infected cells.

In particular, we have assessed core and NS5A abundance by immunohistochemistry, combined with the analysis of histopathological parameters such as liver damage and inflammation. In addition, immunofluorescence images were acquired by confocal microscopy and detailed three-dimensional (3D) colocalization studies were performed with the Imaris software.

Patients and methods

Patients

Thirty-two HCV-infected patients undergoing LT for end-stage liver disease from 2001 to 2010 were included in the study. Selection criteria were based on the availability of liver biopsies performed during both the reperfusion phase (immediately after graft implantation) and the acute phase of graft infection (median time 3 months after LT, range 1–6 months), and were performed either per protocol or when clinically indicated. Serum HCV-RNA levels should be higher than $6 \log_{10}$ IU/ml during the acute phase of HCV infection in order to be included in the study. Follow-up liver biopsies from 23 patients, performed at a median time of 16 months after transplantation (range 7–74 months), were also included in the study. As paired negative controls, we used the reperfusion liver biopsies, which were all from HCV-negative donors. Additional negative control biopsies belonging to 10 non-HCV LT recipients were also included (Supplementary Table 1).

In order to strengthen our results, we included a validation cohort consisting of 11 HCV-infected patients undergoing LT in another liver transplant center (Hospital Universitari Vall d'Hebron). Patients were selected according to the abovementioned selection criteria and biopsies obtained at the indicated time points were analyzed (Supplementary data: Validation cohort).

All patients provided informed written consent for the use of their tissue samples. Our study was approved by the Ethics Committee of Hospital Clínic Barcelona in accordance with the guidelines set forth in the 1975 Declaration of Helsinki.

Viral load determination and HCV genotyping

Viral load was determined by real-time PCR (COBAS TaqMan HCV Test, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). HCV genotype was determined by restriction fragment-length polymorphism of the 5' non-coding region of the HCV genome, as previously described [9].

Histological analysis of liver tissue specimens

Liver samples were processed at the Hospital Clínic Barcelona Pathology Department. All tissue samples were FFPE. For diagnostic purposes, samples were routinely stained with hematoxylin-eosin, reticulin, and Masson's trichrome, and then examined by an expert liver pathologist (R.M.). Histological lesions were evaluated using the Ishak score system [10]. Although this system was designed and is widely used for grading chronic hepatitis, we also used the Ishak score to assess necroinflammatory activity in biopsies obtained during the acute hepatitis phase in order to follow a standardized and reproducible system.

Immunostaining techniques

Five-micrometer sections were cut from paraffin blocks and mounted on charged slides. For immunoperoxidase staining, we used the Bond Polymer Refine Detection and the Bond-maX automated system (Leica Microsystems, Exton, PA, USA). Immunofluorescence was performed as previously described [11], using the following primary antibodies: 1 μ g/ml mouse monoclonal IgG₁ anti-core C7-50 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) [12]; 5 μ g/ml rabbit polyclonal anti-NS5A antibody [13], 0.25 μ g/ml mouse monoclonal IgG₁ anti-adipophilin AP125 (Fitzgerald Industries International, MA, USA). Secondary antibodies were: AlexaFluor

or[®] 488 goat anti-rabbit IgG and AlexaFluor[®] 568 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). *In vitro* specificity of anti-core and anti-NS5A antibodies is shown in Supplementary Fig. 1.

Quantification of HCV-infected hepatocytes

From each tissue sample, 5–20 images from the optical microscope (Olympus BX51) were captured at 40 \times magnification. On average, 800 hepatocytes were counted per sample. The proportion of HCV core antigen-positive cells was determined by manually identifying those individual hepatocytes that displayed cytoplasmic staining within each field, as assessed by two independent observers in a blinded fashion (L.M. and R.M.). There was an excellent correlation between the two observers (Intraclass correlation coefficient 0.9, $p < 0.001$).

Analysis of HCV antigen expression by confocal microscopy

Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Exton, PA) and acquisition was carried out with the 63 \times -oil immersion objective (NA 1.4) at zoom 4 with a Z-step of 0.40–0.45 μ m through the entire volume of the FFPE section. All collected images were deconvolved by Huygens Essential software (v4.0, Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands) and image volumes were reconstructed from sequential z-sections. Colocalization analyses were performed using Imaris software (v7.0, Bitplane AG, Zurich, Switzerland). Single cells were selected as regions of interest (ROI). Surface rendering and channel masking were used in conjunction with manual thresholding to calculate protein colocalization statistics in a 3D environment. The colocalization level was measured as the percent of volume of the channel above the colocalized threshold. A second measure of the degree of colocalization was obtained by calculating the correlation between the intensities of the colocalized voxels in the ROI volume (Pearson's correlation).

Statistical methods

Quantitative variables are expressed as medians (range). For categorical variables, differences between groups were calculated using the Pearson's Chi-square test. Differences between independent quantitative variables were analyzed with the Mann-Whitney non-parametric test. Correlations between quantitative variables were expressed by the Pearson's coefficient. Statistical analysis was performed with PASW Statistics v18.0.

Results

Patient characteristics

Thirty-two HCV-infected patients undergoing LT were included in the study (19 males and 13 females). The median recipient age was 56 years (range 39–67) and the median donor age was 55 years (range 20–76). As shown in Table 1, 9% of the patients were infected with HCV genotype 1a, 88% with genotype 1b and 3% with genotype 3. Median HCV-RNA levels during the acute phase of recurrent hepatitis C was 7.3 \log_{10} IU/ml (range 6.0–9.0). Twenty-six (81%) patients received antiviral therapy (pegylated interferon plus ribavirin) after LT. Among these, 10 (38%) achieved a sustained virological response (SVR), defined as undetectable HCV-RNA 24 weeks after treatment withdrawal. Supplementary Table 2 summarizes the laboratory data of the 32 HCV-infected LT recipients included in this study. Comprehensive HCV kinetics of patients that did not receive antiviral treatment after LT is shown in Supplementary Fig. 2.

Histopathological findings

Overall, reperfusion wedge biopsies showed mild ischemia-reperfusion injury. No other histological lesions were detected. In acute phase biopsies, the main histopathological diagnosis

Table 1. Virological characteristics of the patients included in the study.

Case	HCV genotype	Pre-LT HCV-RNA (log ₁₀ IU/ml)	Reperfusion % Core ^a	Acute phase			Follow-up phase		
				% Core ^a	HCV-RNA (log ₁₀ IU/ml)	% Core ^a	HCV-RNA (log ₁₀ IU/ml)	Antiviral therapy	SVR
1	1b	6.0	0	40	9.0	0	0	Yes	Yes
2	1b	3.7	0	79	9.0	0	0	Yes	Yes
3	1b	4.7	0	79	8.6	n.a.	n.a.	Yes	No
4	1b	5.0	0	12	8.6	n.a.	n.a.	Yes	No
5	1b	3.3	0	10	8.2	n.a.	n.a.	No	No
6	1b	6.1	0	39	8.1	n.a.	n.a.	Yes	No
7	1b	3.3	0	40	7.9	n.a.	n.a.	Yes	No
8	1b	5.7	0	8	7.9	n.a.	n.a.	No	No
9	1b	1.0	0	17	7.8	0	0	Yes	Yes
10	1a	5.7	0	23	7.7	n.a.	n.a.	Yes	No
11	1b	4.9	0	31	7.6	30	6.6	Yes	No
12	1a	5.6	0	2	7.5	7	6.1	Yes	No
13	1b	5.1	0	0	7.4	n.a.	n.a.	Yes	No
14	1a	4.4	0	26	7.4	0	3.7	Yes	No
15 ^b	1b	5.9	0	8	7.4	0	0	Yes	No
16	1b	4.8	0	0	7.4	0	5.8	Yes	No
17	1b	4.2	0	1	7.4	0	6.8	Yes	No
18	1b	4.4	0	26	7.3	0	0	Yes	Yes
19	1b	5.2	0	0	7.2	0	6.5	No	No
20	1b	4.5	0	27	7.0	27	6.4	Yes	No
21	1b	3.4	0	33	6.9	0	2.2	Yes	No
22	1b	6.7	0	9	6.8	0	0	Yes	Yes
23	1b	5.8	0	66	6.8	0	0	Yes	Yes
24	1b	6.6	0	0	6.7	0	0	Yes	Yes
25	1b	6.4	0	17	6.7	0	0	Yes	Yes
26	1b	3.7	0	0	6.7	0	4.8	No	No
27	1b	4.7	0	45	6.7	7	4.9	Yes	No
28	1b	5.9	0	8	6.6	n.a.	n.a.	Yes	No
29	1b	1.0	0	0	6.6	0	0	Yes	Yes
30	3	3.2	0	27	6.4	0	0	Yes	Yes
31	1b	3.7	0	0	6.1	0	5.8	No	No
32	1b	4.9	0	0	6.0	0	5.8	No	No

n.a., not available.

^a% Core: percentage of core-positive hepatocytes.

^bPatient 15 started antiviral therapy in March 2005. The follow-up biopsy included in the study was obtained in March 2006, while still on therapy, at which time point viral load was undetectable. However, the patient did not achieve an SVR because he relapsed in August 2006.

was acute hepatitis, which was found in 26 patients (81%). Eight of these patients involved a secondary diagnosis: mild cellular rejection was observed in 2 cases, focal perivenular confluent necrosis in 3 cases, focal features of venous outflow obstruction (VOOD) in 1 case, periportal cholangiolar reaction with biliary thrombus suggestive of sepsis in 1 case and marked steatosis in 1 case. According to the definition by Wiesner *et al.* [14], which takes into account clinical, virological and histological parameters, recurrent cholestatic hepatitis was diagnosed in 14 cases.

Regarding the 23 follow-up samples analyzed, a diagnosis of chronic hepatitis was observed in 19 cases, one of which also displayed features of VOOD. In the remaining 4 cases, we observed steatosis (2), focal ballooning (1) or the absence of any histological changes (1).

Detection of HCV core protein in FFPE liver samples

Core immunostaining was performed in FFPE liver sections obtained at the time of graft reperfusion (negative control), during the acute phase of hepatitis C recurrence and during follow-up after LT (Table 1 and Fig. 1). To exclude any unspecific staining, we also analyzed 28 liver samples belonging to 10 non-HCV infected patients undergoing LT. Each sample was tested twice in a blinded manner, and in each run we included positive controls to assess the validity and reproducibility of the assay.

All the reperfusion biopsies from the 32 HCV infected patients were negative for the core protein detection (Fig. 1). Likewise, no HCV core staining was detected in any of the liver biopsies from the 10 non-HCV LT recipients (neither at reperfusion nor after LT, data not shown).

Transplantation

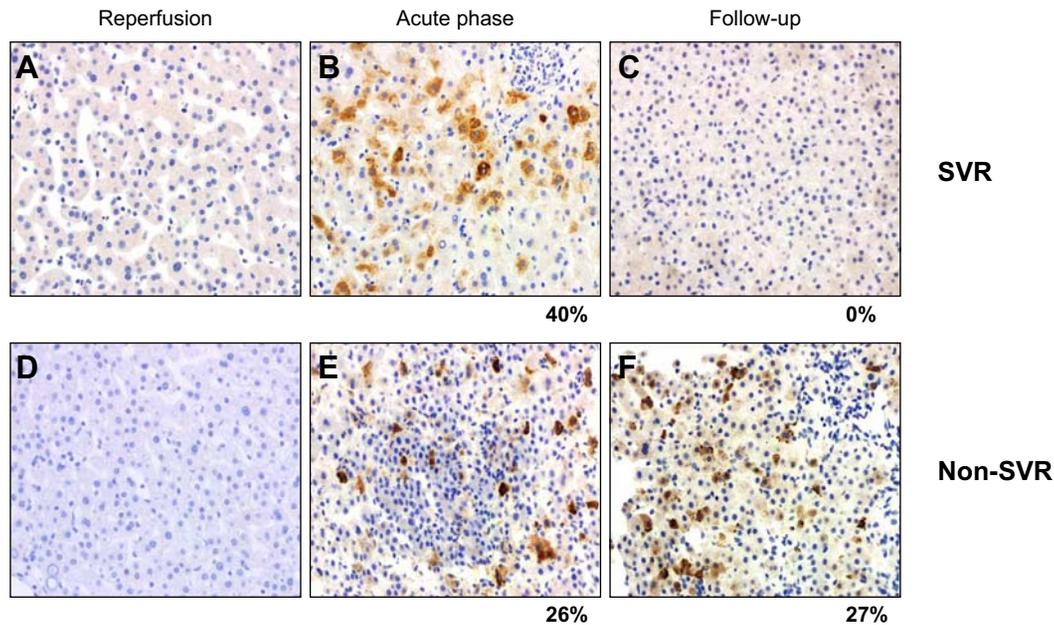


Fig. 1. HCV core detection in liver sections from 2 representative patients that received antiviral treatment for hepatitis C recurrence after LT. (A–C) Patient 1 achieved an SVR. (D–F) Patient 20 did not respond to antiviral treatment. Samples were obtained at the time of reperfusion (A and D), during the acute phase of hepatitis C (B and E) and at follow-up after treatment (C and F) (magnification, 20 \times).

Twenty-four out of 32 (75%) liver biopsies obtained during the acute phase of hepatitis C recurrence showed expression of the core protein. HCV core was expressed in the cytoplasm of hepatocytes as a diffuse granular pattern of variable intensity (Fig. 2A–C). We could not identify HCV core antigen in other cell types (stellate cells, cholangiocytes or stromal cells). HCV core-positive hepatocytes were randomly distributed throughout the liver section, exhibiting a slight propensity to concentrate in hepatocytes of the periportal areas. In a few cases, particularly those acute phase biopsies with a high percentage of infected cells, clusters of core-positive hepatocytes were identified (Fig. 2C).

The median percentage of core-positive hepatocytes in biopsies obtained during the acute phase of HCV infection was 26% (range 1–79). The intensity of core immunostaining was highly variable. Fourteen out of the 24 positive biopsies showed hepatocytes with high core expression intermixed with others with low core expression (Fig. 2). In the remaining 10 cases, hepatocytes with a diffuse faint staining were detected. Of interest was the presence of brisk stained ring-like structures (suggesting the localization of core protein around the lipid droplets) [15], which were mainly located along the sinusoidal membrane of some hepatocytes, particularly in those cases with a high viral load (Fig. 2D and E).

Follow-up biopsies from the 10 patients who had achieved an SVR were all negative for HCV core staining (Fig. 1). Only 4 of the 12 (33%) follow-up biopsies belonging to patients with chronic hepatitis and detectable HCV-RNA were positive for HCV core antigen expression. In such cases, the median percentage of core-positive hepatocytes was lower than in the acute phase (17% vs. 26%, respectively).

These results were confirmed in the validation cohort of another transplant center: first, we did not detect core antigen

in any of the reperfusion biopsies and second, core expression was detected in 60% and 40% of acute phase and follow-up biopsies, respectively (Supplementary Table 3).

As an additional data of interest, all the acute-phase and follow-up biopsies that were positive for the core protein were also positive for NS5A immunolabeling. In these samples, the pattern of expression of NS5A was similar to that observed for the core antigen. Likewise, all reperfusion biopsies, non-HCV controls and follow-up samples from patients who had achieved an SVR, were negative for NS5A detection (Supplementary Figs. 3 and 4).

Relationship between HCV core staining and clinical/histological features

In order to evaluate histological lesions in a standardized manner, we used the Ishak score to assess necroinflammatory activity in biopsies obtained during the acute phase of hepatitis C recurrence. We found a significant correlation between the percentage of core-positive hepatocytes and lobular inflammatory activity (Ishak, $r = 0.51$, $p = 0.003$). In addition, we found a significant correlation between the percentage of core-positive hepatocytes and AST ($r = 0.63$, $p = 0.000$) and ALT levels ($r = 0.39$, $p = 0.029$).

Overall, there was a significant association between viral load and detection of HCV core in liver biopsies ($p = 0.004$). Indeed, core immunostaining was positive in all liver samples ($n = 6$) with HCV-RNA levels higher than $8 \log_{10}$ IU/ml, in 68% ($n = 21$) of those patients with viral loads between 6 and $8 \log_{10}$ IU/ml and only in 14% ($n = 1$) of patients with HCV-RNA below $6 \log_{10}$ IU/ml. As expected, cholestatic hepatitis after LT was significantly associated with high HCV-RNA levels compared to typical lobular hepatitis ($p = 0.003$). Likewise, all cholestatic hepatitis biopsies were positive for HCV core detection, whereas we only detected

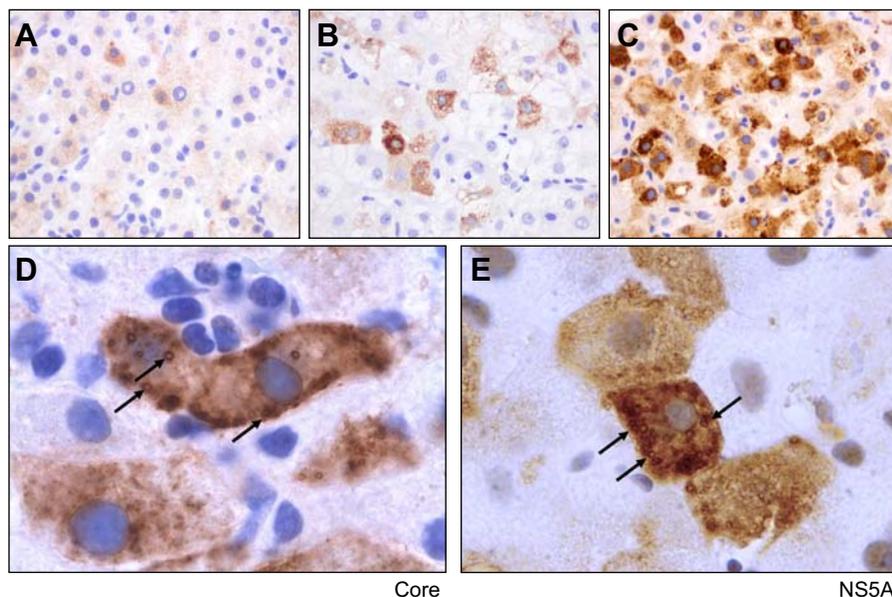


Fig. 2. HCV core staining in acute-phase liver biopsies. (A) Patient 18: low staining intensity; (B) Patient 14: mixed staining intensity; (C) Patient 2: predominantly high intensity (magnification, 40 \times). (D) HCV core and (E) NS5A staining showing an intense ring-like pattern mainly localized at the sinusoidal pole of the hepatocytes (magnification, 100 \times).

the core antigen in 56% of biopsies with typical lobular hepatitis ($p = 0.004$) (Supplementary Fig. 5).

Tissue colocalization of viral proteins

In order to confirm the specificity of the immunological detection and to further investigate the localization (relative position) of HCV core and NS5A proteins in hepatocyte cytoplasm, we analyzed the colocalization of viral proteins with high-resolution immunofluorescence microscopy. To this aim, we performed double immunolabeling of core and NS5A proteins in 8 selected samples obtained during the acute phase of recurrent hepatitis C, which had a high percentage of core-positive cells.

Overall, we observed a strong colocalization of core and NS5A within hepatocytes (Fig. 3). To determine colocalization percentages more precisely, we selected single hepatocytes expressing both HCV NS5A and core proteins, and calculated the colocalization percentage within each cell. Our results showed that, on average, 55% of the HCV core volume (above threshold) colocalized with NS5A (range 23–75) and that 66% of NS5A volume colocalized with core protein (range 31–93). The intensity correlation coefficient between colocalized voxels varied significantly between samples ($r = 0.67$, range 0.31–0.89).

In addition, to accurately elucidate the relative position of HCV core and NS5A proteins within hepatocytes, we performed detailed 3D analysis of single-infected hepatocytes using the Imaris software (Fig. 3). We observed that when core and NS5A colocalized, they formed ring-like structures of variable diameters (range 0.84–4.78 μm), in which core localized mainly in the inner area while NS5A surrounded the core protein. These data are in agreement with recent *in vitro* studies showing that core and NS5A are in close proximity to the lipid droplets where they colocalize [15]. We also assessed the localization of HCV antigens around the lipid droplets in the human liver by analyzing the colocalization of NS5A and adipophilin, a lipid droplet

marker (Fig. 4). Colocalization analyses in double-positive hepatocytes showed that 36% of the HCV NS5A volume colocalized with adipophilin (range 13–78). Moreover, the 3D reconstruction analysis of confocal image sections showed very clearly that when NS5A colocalized with adipophilin, NS5A surrounded the adipophilin-positive area.

Discussion

Hepatitis C recurrence occurs shortly after LT and may cause severe liver graft injury, leading to graft loss in a high percentage of patients [1,2]. Accurate histological diagnosis of recurrent hepatitis C is important to indicate antiviral therapy. Although the histopathological diagnosis of acute hepatitis C is usually straightforward, atypical histological features of HCV infection occur in some patients leading to a difficult differential diagnosis with other entities (such as acute cellular rejection, biliary pathology and/or drug-induced liver injury). Thus, the detection of native HCV antigens in liver tissue may be relevant to diagnostic purposes. Moreover, it may contribute to a better understanding of the life cycle and pathogenesis of HCV infection.

The detection of HCV proteins or viral RNA in the liver has proven to be a technically challenging endeavor and one that has often produced conflicting results. Although several antibodies have been generated for the detection of HCV antigens in the liver [12,16–18], results are sometimes fraught with inconsistencies due to differences in sensitivity and/or specificity. In this study, we have analyzed the presence of HCV antigens in FFPE liver biopsies from LT patients with recurrent hepatitis C, using immunohistochemistry and confocal microscopy.

For the immunohistochemical detection of the HCV core protein, we have used a commercial mouse monoclonal (C7-50) antibody which has been successfully utilized to detect HCV core antigen in human and chimpanzee liver tissue [8,12]. While we

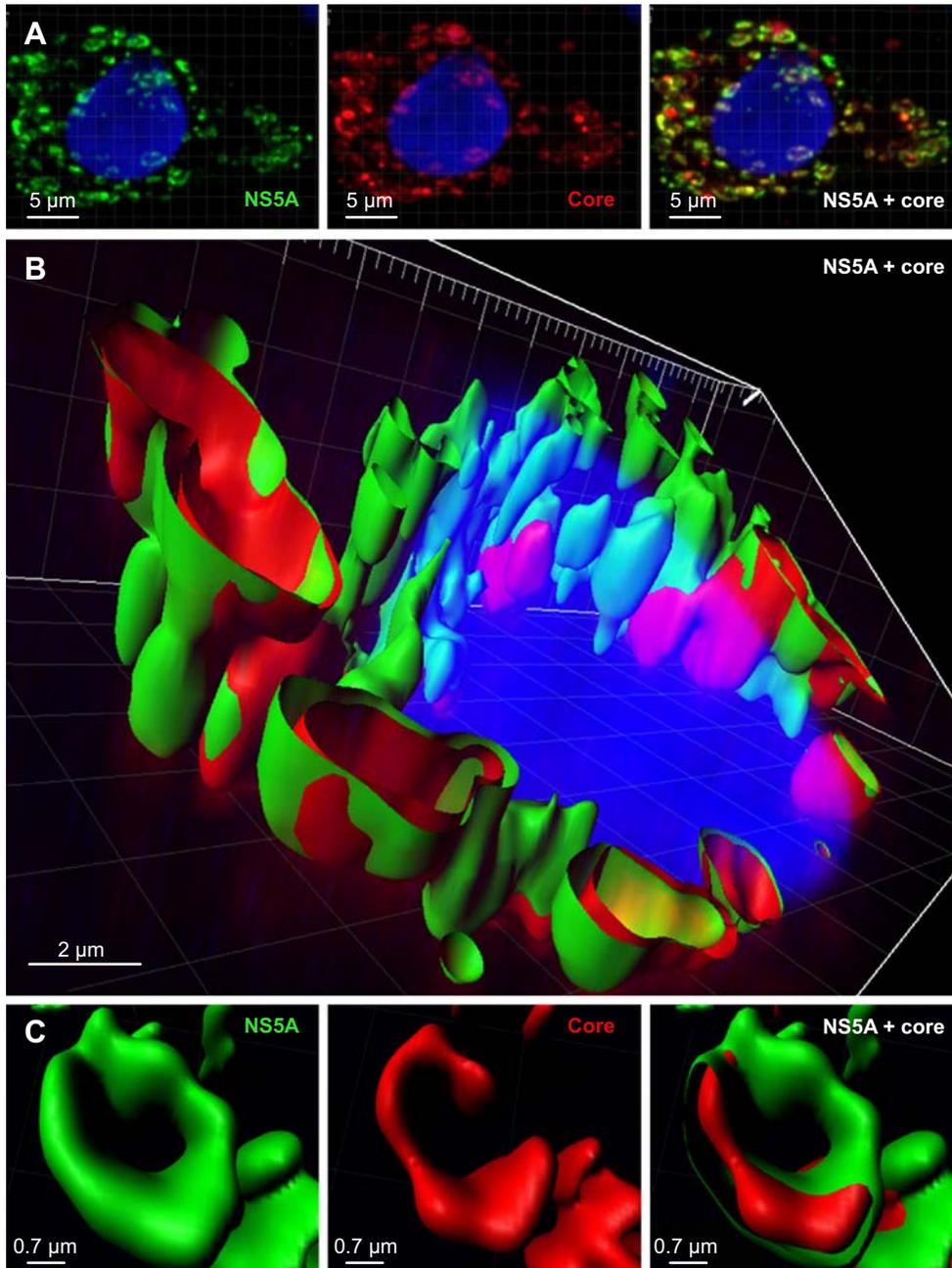


Fig. 3. Colocalization of HCV core and NS5A antigens. (A) Confocal images of an acute-phase liver biopsy from Patient 20 dually labeled for HCV NS5A (green) and core (red) (magnification 63 \times , zoom 4). (B) Cross-section of a 3D reconstruction of an HCV-infected hepatocyte showing the relative position of core and NS5A, with core localized inside and NS5A mainly at the periphery of ring-like structures. (C) A detailed 3D reconstruction of one ring-like structure.

were able to detect HCV core protein in most of the liver biopsies obtained during the acute phase of hepatitis C recurrence, this was true in only one third of follow-up biopsies obtained during the chronic phase of hepatitis C recurrence following LT. Why we were not able to detect viral antigens in a significant proportion of biopsies obtained during the chronic hepatitis phase remains unclear. One hypothesis is that after HCV has disseminated throughout the entire liver over time, the concentration of viral antigens per infected hepatocyte is low. Alternatively, as previously hypothesized for hepatitis B virus infection, it is possible

that cells with positively-staining cytoplasm may be at an early stage of viral replication and may have not yet developed external viral determinants. As soon as these do appear, the cell would be promptly destroyed by the immune system [19]. In addition, during the chronic phase of hepatitis C recurrence, patients have lower viral loads compared to those in the acute phase, probably due to a lower level of immunosuppression and, in consequence, to a stronger immune response against HCV. In this regard, we found an association between viral load and detection of HCV core in hepatocytes: more than 70% of the samples from patients

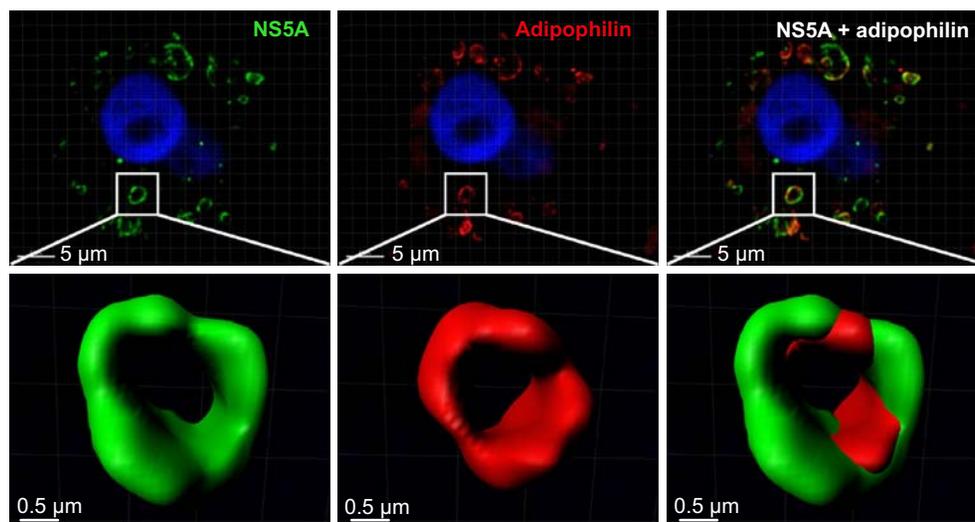


Fig. 4. Colocalization of HCV NS5A and adipophilin. Confocal images of an acute-phase liver biopsy from Patient 21 dually labeled for HCV NS5A (green) and adipophilin (red). As shown in the magnification of the lipid droplet, NS5A is mainly localized in the area surrounding the adipophilin (magnification 63 \times , zoom 4).

with viral load higher than 6 log₁₀ IU were positive for core staining, while only 14% of samples from patients with viral load below 6 log₁₀ IU/ml were positive for HCV core detection.

We also found a significant correlation between core antigen detection and liver enzymes and inflammatory activity [20]. Likewise, the high percentage of core-positive hepatocytes (57%) in biopsies showing perivenular confluent necrosis and features of VOOD, suggests that this morphological factor could indicate a more aggressive nature of an HCV infection. Further studies are needed to confirm these observations in larger cohorts of patients.

In agreement with previous studies, HCV antigen localization was restricted to the hepatocyte cytoplasm, showing both granular and diffuse patterns [7,17,18,21]. Liang *et al.* have recently postulated that HCV infection may involve a limited number of cells, linking the focal nature of HCV infection to direct cell-to-cell transmission [8]. However, we found that isolated HCV positive hepatocytes, rather than forming clusters, were mostly randomly distributed throughout the liver section, and that the intensity of staining varied between hepatocytes within the same liver section. Since we used FFPE tissue samples, we cannot rule out the possibility that either low antigen abundance, or suboptimal antigen retrieval might have compromised the sensitivity of our detection system.

High-resolution immunofluorescence images were acquired by confocal microscopy in order to characterize the location of viral proteins. We observed that NS5A and core proteins colocalized in the hepatocyte cytoplasm. In some cases, they formed ring-like structures (similar to lipid droplets) in which the core protein was localized internally and NS5A largely in the periphery. Recent studies have shown that the lipid droplets are important organelles required for the production of infectious virus particles *in vitro* [15,22]. Thus, the core protein recruits NS proteins and RNA replication complexes to sites adjacent to lipid droplets. By using FFPE liver samples, we have shown that NS5A also colocalizes with adipophilin, a structural lipid droplet-associated protein. This *in vivo* observation is in

agreement with the reports describing the *in vitro* localization of core and NS5A proteins in close proximity to the lipid droplets.

One of the limitations of our study is that we only detected HCV antigens in a small proportion of liver samples from chronic hepatitis C patients, which hinders the applicability of the method in clinical practice. Nevertheless, it may be possible to increase the sensitivity in future studies. Since the detection of genuine HCV antigens in the infected liver is a difficult and important subject, we have validated our results in an independent cohort from another hospital and provided robust and high quality HCV imaging in FFPE liver biopsies (routinely available in most clinical centers).

In conclusion, we have demonstrated that HCV antigens, core and NS5A, are selectively expressed in hepatocytes. The absence of core and NS5A in reperfusion biopsies, as well as their loss following treatment-induced viral clearance, supports the specificity of our findings. More interestingly, this is the first study that provides *in vivo* confirmation of core and NS5A colocalization around the lipid droplets, supporting their role in HCV particle production.

Financial support

X. Forns and M. Navasa received support, in part, by grants from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad (PI11/01907 and PI10/01551, respectively), co-funded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Una manera de hacer Europa. X. Forns also received a grant from the Roche Organ Transplantation Research Foundation (ROTRF, CI: 442035057). The other authors were supported by grants from the following institutions: L. Mensa from Ministerio de Economía y Competitividad, M. Coto-Llerena from the Roche Organ Transplantation Research Foundation and C. Fernández-Carrillo from Asociación Española para el Estudio del Hígado.

Research Article

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declare that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgements

The rabbit polyclonal anti-NS5A antibody was a kind gift from Dr. Craig Cameron (Penn State University, State College, PA). We thank the Advanced Optical Microscopy Facility of the Scientific and Technological Services of the University of Barcelona CCI-UB for technical support with the confocal microscope.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.023>.

References

- [1] Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, et al. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002;35:680–687.
- [2] Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol* 2001;35:666–678.
- [3] Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002;122:889–896.
- [4] Blight K, Rowland R, Hall PD, Lesniewski RR, Trowbridge R, LaBrooy JT, et al. Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology. *Am J Pathol* 1993;143:1568–1573.
- [5] Gonzalez-Peralta RP, Fang JW, Davis GL, Gish R, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, et al. Optimization for the detection of hepatitis C virus antigens in the liver. *J Hepatol* 1994;20:143–147.
- [6] Agnello V, Abel G, Knight GB, Muchmore E. Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998;28:573–584.
- [7] Fenwick F, Bassendine MF, Agarwal K, Bevvitt D, Pumeechockchai W, Burt AD, et al. Immunohistochemical assessment of hepatitis C virus antigen in cholestatic hepatitis after liver transplantation. *J Clin Pathol* 2006;59:174–178.
- [8] Liang Y, Shilagard T, Xiao SY, Snyder N, Lau D, Cicalese L, et al. Visualizing hepatitis C virus infections in human liver by two-photon microscopy. *Gastroenterology* 2009;137:1448–1458.
- [9] Lopez-Labrador FX, Ampurdanes S, Forns X, Castells A, Saiz JC, Costa J, et al. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1997;27:959–965.
- [10] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De GJ, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696–699.
- [11] Mensa L, Crespo G, Gastinger MJ, Kabat J, Perez-del-Pulgar S, Miquel R, et al. Hepatitis C virus receptors claudin-1 and occludin after liver transplantation and influence on early viral kinetics. *Hepatology* 2011;53:1436–1445.
- [12] Moradpour D, Wakita T, Tokushige K, Carlson RI, Krawczynski K, Wands JR. Characterization of three novel monoclonal antibodies against hepatitis C virus core protein. *J Med Virol* 1996;48:234–241.
- [13] Huang L, Sineva EV, Hargittai MR, Sharma SD, Suthar M, Raney KD, et al. Purification and characterization of hepatitis C virus non-structural protein 5A expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2004;37:144–153.
- [14] Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003;9:S1–S9.
- [15] Miyazaki Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007;9:1089–1097.
- [16] Krawczynski K, Beach MJ, Bradley DW, Kuo G, Di Bisceglie AM, Houghton M, et al. Hepatitis C virus antigen in hepatocytes: immunomorphologic detection and identification. *Gastroenterology* 1992;103:622–629.
- [17] Verslype C, Nevens F, Sinelli N, Clarysse C, Pirenne J, Depla E, et al. Hepatic immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against HCV-E2 to evaluate antiviral therapy and reinfection of liver grafts in hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 2003;38:208–214.
- [18] Sadamori H, Yagi T, Iwagaki H, Matsuda H, Shinoura S, Umeda Y, et al. Immunohistochemical staining of liver grafts with a monoclonal antibody against HCV-Envelope 2 for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:574–580.
- [19] Portmann B, Galbraith RM, Eddleston AL, Zuckerman AJ, Williams R. Detection of HBSAG in fixed liver tissue – use of a modified immunofluorescent technique and comparison with histochemical methods. *Gut* 1976;17:1–9.
- [20] Negro F, Pacchioni D, Shimizu Y, Miller RH, Bussolati G, Purcell RH, et al. Detection of intrahepatic replication of hepatitis C virus RNA by in situ hybridization and comparison with histopathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:2247–2251.
- [21] Pessoa MG, Alves VA, Wakamatsu A, Gomes JG, Maertens G, Van der BB, et al. Post-transplant recurrent hepatitis C: immunohistochemical detection of hepatitis C virus core antigen and possible pathogenic implications. *Liver Int* 2008;28:807–813.
- [22] Counihan NA, Rawlinson SM, Lindenbach BD. Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002302.

Supplementary Material

Validation cohort

Validation cohort characteristics

Eleven HCV-infected patients undergoing LT in Hospital Universitari Vall d'Hebron were selected as independent validation cohort (5 males and 6 females). Selection criteria were the same as in our study cohort. We selected HCV-infected patients undergoing LT who had liver biopsies performed during both the reperfusion phase (immediately after graft implantation), the acute phase of graft infection (median time 4 months after LT, range 1-6 months) and during follow-up (median time 12 months after LT, range 9-40 months). In addition, serum HCV-RNA levels should be higher than 6 log₁₀ IU/mL during the acute phase of HCV infection.

The median recipient age was 57 years (range 47-65) and the median donor age was 71 years (range 22-81). Sixty-four percent of the patients were infected with HCV genotype 1, 18% with genotype 2 and 18% with genotype 3. Median HCV-RNA levels during the acute phase of recurrent hepatitis C was 7.1 log₁₀ IU/ml (range 6.2-8.7). One patient received antiviral therapy (pegylated interferon plus ribavirin) after LT and achieved a SVR withdrawal. The virological characteristics of the validation cohort are shown in Supplementary Table 3.

Histopathological findings in the validation cohort

Reperfusion biopsies showed mild ischemia-reperfusion injury. In acute phase biopsies, the main histopathological diagnosis was acute hepatitis, which was found in 8 patients (73%). Of the remaining three, one case showed minimal

inflammatory changes (mild acute hepatitis), another presented severe steatosis with very mild lobular inflammation and the last one presented a fibrosing cholestatic hepatitis pattern. Regarding the 10 follow-up samples analyzed, a diagnosis of chronic hepatitis was observed in 7 cases and of cirrhosis in 3 cases.

Detection of HCV core protein in liver samples from the validation cohort

In agreement with our results, we did not detect core antigen in any of the reperfusion samples. Sixty and 40% of acute phase and follow-up biopsies were positive for the core antigen, respectively. The percentages of core-positive hepatocytes tended to be a lower than in our 32 patients but this may be in part due to the small sample size, the fact that viral loads of the validation cohort are a little lower than ours and probably other factors that may influence antigen retrieval (fixation buffer, time of fixation, etc) which depend on the histopathological techniques used in each center.

Supplementary Table 1. Summary of serial liver biopsies collected from HCV-infected and non-HCV LT recipients.

LT recipients	Number of samples obtained		
	during graft reperfusion	1-6 months	after LT 7-74 months
HCV (n= 32)	32	32	23 ^a
Non-HCV ^b (n= 10)	10	9	9

^a Ten of the 23 follow-up liver biopsies belonged to patients who had achieved a SVR.

^b The indications for LT in these non-HCV controls were alcoholic cirrhosis (4), hepatitis B (3), nonalcoholic steatohepatitis (1), familiar amyloidotic polyneuropathy (1) and primary sclerosing cholangitis (1)

n, number of LT recipients.

Supplementary Table 2. Laboratory data of the patients included in the study

Case	Acute phase				Follow-up phase			
	ALT	AST	AP	BIL	ALT	AST	AP	BIL
1	369	184	826	14.0	56	66	291	0.7
2	275	649	777	3.5	74	40	1785	2.5
3	540	456	777	7.4	NA	NA	NA	NA
4	363	155	304	8.1	NA	NA	NA	NA
5	170	249	1413	6.4	NA	NA	NA	NA
6	340	314	353	12.5	208	200	327	4.2
7	205	196	1031	16.1	NA	NA	NA	NA
8	136	136	535	17.3	NA	NA	NA	NA
9	453	188	195	1.1	19	21	216	0.8
10	193	234	323	10.4	NA	NA	NA	NA
11	479	230	455	1.5	77	103	232	0.5
12	354	202	798	2.5	291	138	387	5.7
13	49	24	155	0.7	76	50	523	0.6
14	232	182	610	14.2	69	39	982	3.0
15 ^b	678	498	279	1.9	63	87	198	1.1
16	152	122	729	3.3	80	68	806	1.9
17	171	65	1167	6.5	48	39	321	1.8
18	545	419	362	1.5	18	16	162	1.0
19	54	46	183	1.1	33	26	153	1.1
20	152	64	287	17.0	184	330	176	1.1
21	407	318	1059	1.6	122	74	575	17.4
22	281	145	139	1.2	29	23	193	0.4
23	309	213	218	1.5	24	20	179	0.8
24	461	333	961	6.1	70	133	794	0.9
25	193	85	154	0.9	29	17	167	0.6
26	139	49	241	1.1	24	29	171	1.1
27	184	160	737	1.0	180	133	814	1.4
28	133	70	240	1.2	179	237	256	1.1
29	203	105	156	1.0	29	33	206	0.6
30	260	296	308	12.7	20	30	171	1.0
31	109	68	455	0.6	64	90	270	1.0
32	121	233	784	3.4	30	30	1482	0.9

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. AP, alkaline phosphatase, BIL, bilirubin.

Supplementary Table 3. Virological characteristics of the validation cohort

Case	HCV genotype	Pre-LT HCV-RNA (log ₁₀ IU/mL)	Reperfusion	Acute phase		Follow-up phase			
			% Core ^a	% Core ^a	HCV-RNA (log ₁₀ IU/mL)	% Core ^a	HCV-RNA (log ₁₀ IU/mL)	Antiviral therapy	SVR
33	1	6.0	0	70	8.73	NA	NA	Yes	No
34	3	5.3	0	0	7.8	0	7.2	No	No
35	1	5.2	0	20	7.8	0	6.9	No	No
36	1	5.4	0	7	7.4	1	6.9	No	No
37 ^b	1	4.5	0	NA	7.1	0	0	Yes	Yes
38	3	5.6	NA	0	7.1	0	6.2	No	No
39	1	6.2	0	1	7.1	1	6.1	No	No
40	2	5.4	0	0	6.9	0	6.8	No	No
41	1	6.7	0	1	6.6	1	7.2	No	No
42	1	7	NA	1	6.2	0	6.5	No	No
43	2	5.7	0	0	6.2	1	5.7	No	No

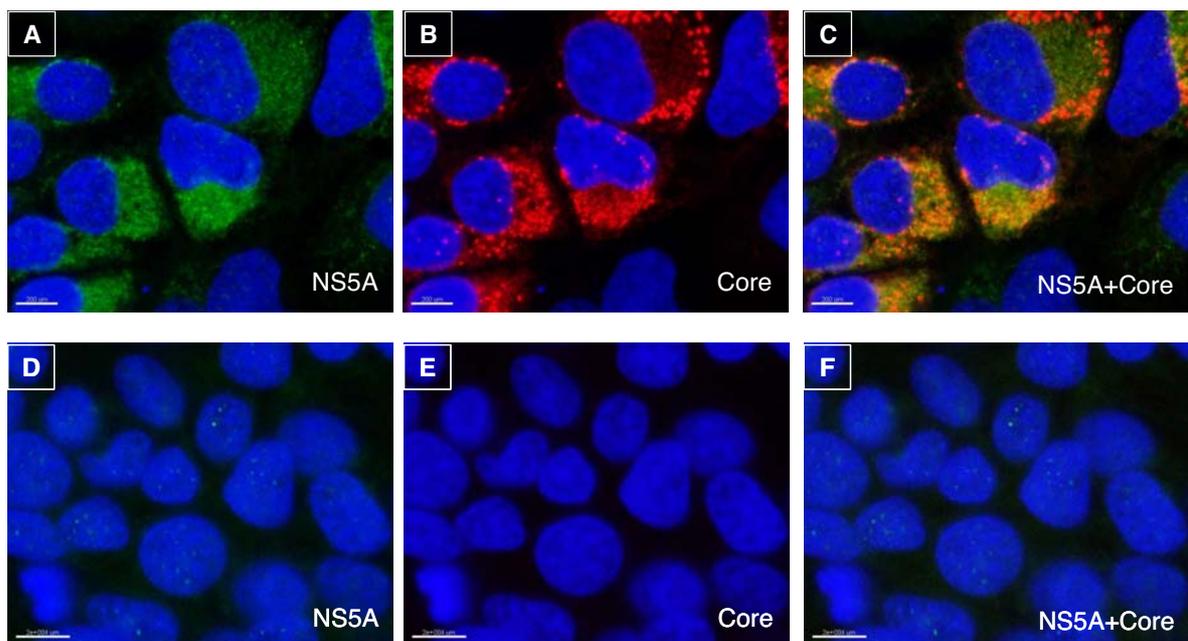
^a % Core: percentage of core-positive hepatocytes.

NA: non available

^b Patient 37 did not have the acute-phase liver biopsy but had a liver biopsy performed one year after LT. This biopsy was obtained just before starting antiviral therapy and was positive for the core antigen (viral load 8.1 log IU/mL).

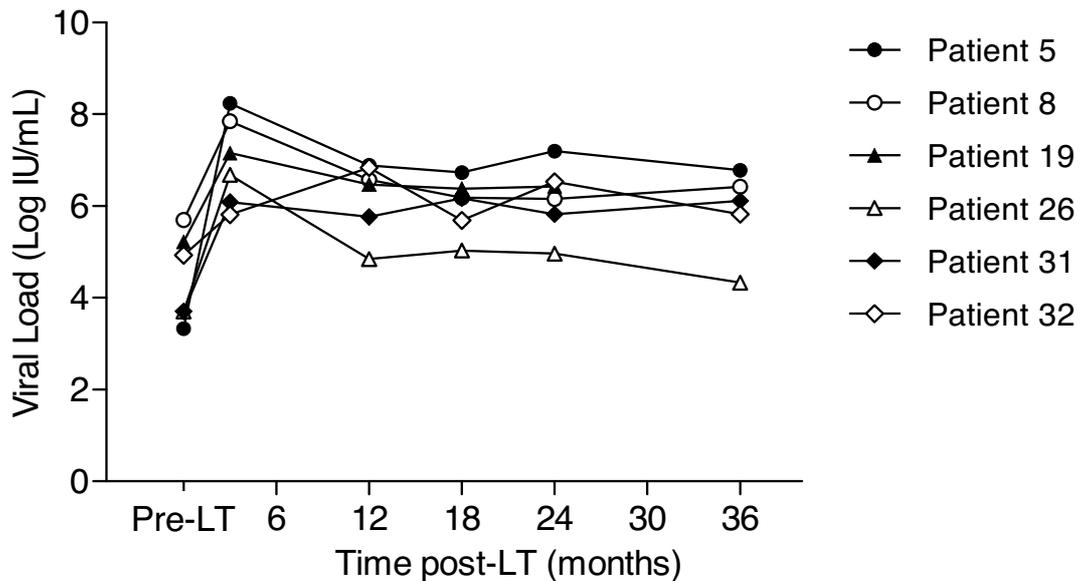
Supplementary Fig. 1. Core and NS5A immunofluorescence in cell culture.

The specificity of the rabbit polyclonal anti-NS5A was assessed *in vitro*. (A to C) Huh7.5 cells infected with cell culture derived HCV (Jc1); (D to F) Naïve Huh7.5 cells. Immunolabeling was performed with the rabbit polyclonal anti-NS5A and mouse monoclonal anti-core C7-50 for 1h, followed by washing and incubation with secondary Alexa Fluor® 488 and 568 conjugated antibodies for 1h at room temperature. Cell nuclei were counterstained with DAPI. NS5A and core showed strong colocalization within the cytoplasm of infected cells. HCV antigen staining was absent in naïve Huh7.5 cells. Images were acquired at 100X magnification.



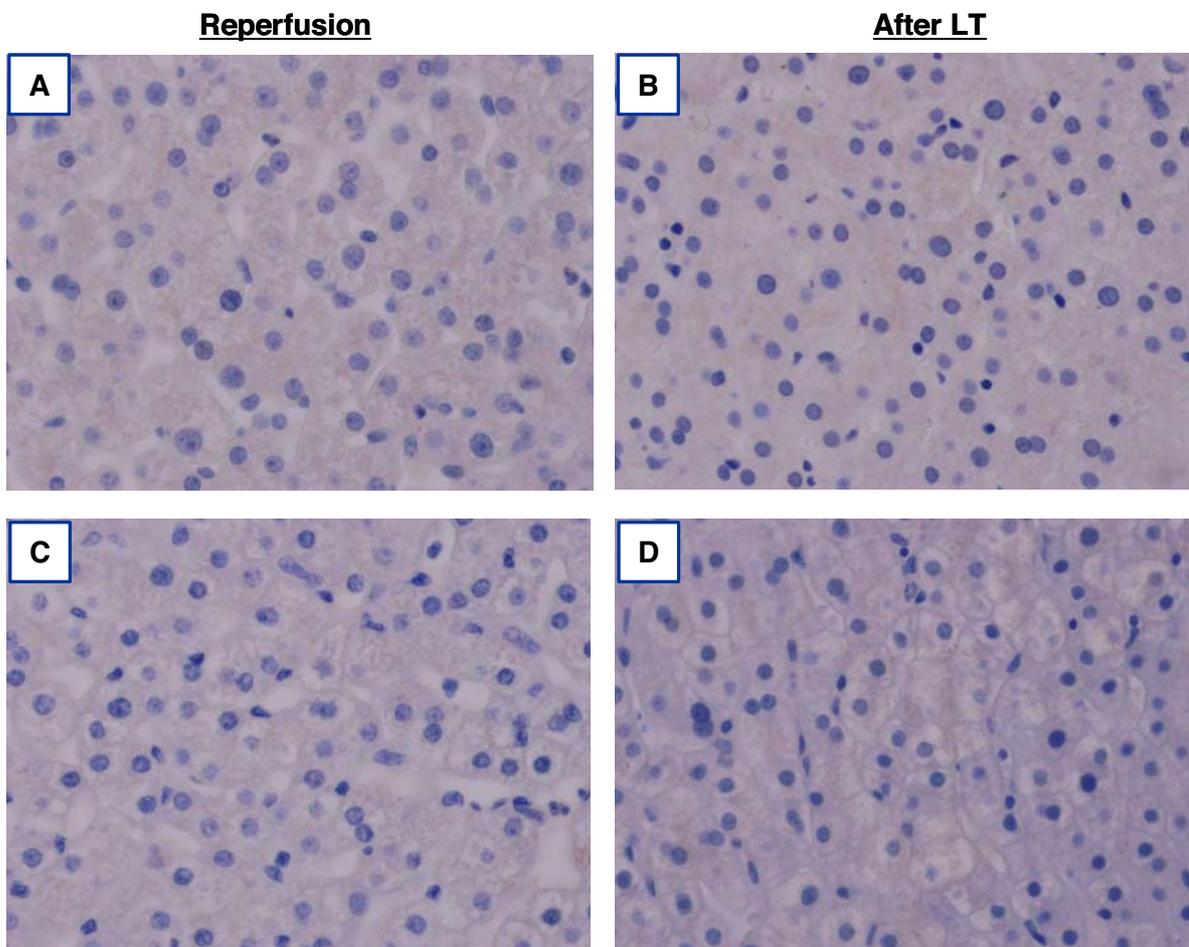
Supplementary Fig. 2. HCV kinetics of non-treated patients during the first

3 years after LT. As previously reported [1,2], viral load values increased progressively during first months after LT. Thereafter, HCV-RNA levels remained higher than pre-LT levels and stable over the years.

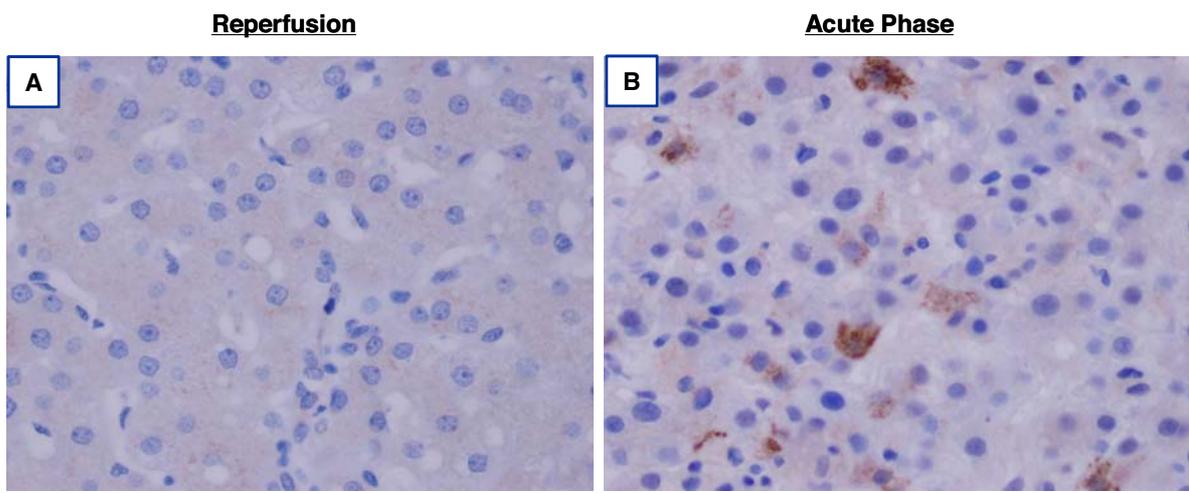


- [1] Garcia-Retortillo M, Forns X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, et al. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology* 2002;35:680-687.
- [2] Dragun J, Pérez-del-Pulgar S, Crespo G, Ramírez S, Coto-Llerena M, Mensa L, et al. Characterization of the cross-neutralizing antibody response against hepatitis C virus in the liver transplantation setting. *Am J Transpl* 2011;11:767-774

Supplementary Fig. 3. HCV NS5A immunostaining in FFPE liver samples from non-HCV LT recipients. The specificity of the rabbit polyclonal anti-NS5A was assessed *in vivo* by using liver biopsies from non-HCV LT recipients. Images from 2 representative patients are shown: (A and B) LT patient infected with the hepatitis B virus; (C and D) patient who underwent LT for alcoholic cirrhosis. All the liver biopsies from the non-HCV LT recipients (either at reperfusion or after LT) were negative for HCV NS5A staining.



Supplementary Fig. 4. NS5A antigen detection in liver biopsies from a representative HCV-infected LT patient (Patient 22) Liver samples were obtained (A) at the time of reperfusion and (B) during the acute phase of hepatitis C. Original magnification 40X.



Supplementary Fig. 5. HCV core immunostaining in FFPE liver samples from patients with cholestatic hepatitis following LT. Images from 4 representative patients are shown: A) Patient 2; B) Patient 3, C) Patient 7 and D) Patient 14. All cholestatic hepatitis biopsies were positive for HCV core detection.

