



FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Tesis Doctoral

***“Papel de la vía de señalización de la insulina y  
mTOR en la infección por el virus de la Hepatitis  
C. Implicación en el desarrollo de carcinoma  
hepatocelular”***

**Doctorando:** Marta María Garcia-Valdecasas Merino

**Directores:** Dr. José Antonio del Campo Castillo y Dr. Manuel Romero Gómez

**Tutor:** José Ricardo Villar Ortiz

Sevilla, Septiembre 2015





D. MANUEL ROMERO GOMÉZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

INFORMA:

Que D<sup>a</sup> Marta María García-Valdecasas Merino, Lda. en Biología, desarrollará el trabajo de Tesis Doctoral en el Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla, bajo mi tutela para lo ***"Papel de la vía de señalización de la insulina y mTOR en la infección por el virus de la Hepatitis C. Implicación en el desarrollo de carcinoma hepatocelular"***.

Y para que conste, expido el presente documento en Sevilla, 15 de febrero del 2013.

Fdo. Dr. Manuel Romero Gómez





D. JOSE VILLAR ORTIZ, CATEDRATICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

INFORMA:

Que D<sup>a</sup> Marta María García-Valdecasas Merino, Lda. en Biología, desarrollará el trabajo de Tesis Doctoral en el Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla, bajo mi tutela para lo ***"Papel de la vía de señalización de la insulina y mTOR en la infección por el virus de la Hepatitis C. Implicación en el desarrollo de carcinoma hepatocelular"***.

Y para que conste, expido el presente documento en Sevilla, 15 de febrero del 2013.

Fdo. Dr. José Villar Ortiz





D. JOSE ANTONIO DEL CAMPO CASTILLO, DOCTOR  
INVESTIGADOR DE LA UNIDAD DE GESTIÓN MÉDICO-  
QUIRURGICA DE ENFERMEDADES DIGESTIVAS Y CIBEREHD EN  
EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE VALME

INFORMA:

Que D<sup>a</sup> Marta María García-Valdecasas Merino, Lda. en Biología,  
desarrollará el trabajo de Tesis Doctoral en el Departamento de Medicina  
de la Universidad de Sevilla, bajo mi tutela para lo ***"Papel de la vía de  
señalización de la insulina y mTOR en la infección por el virus  
de la Hepatitis C. Implicación en el desarrollo de carcinoma  
hepatocelular"***.

Y para que conste, expido el presente documento en Sevilla, 15 de febrero del 2013.

Fdo. Dr. José Antonio del Campo.





## AGRADECIMIENTOS

En estos cuatro años de realización personal, de aprendizaje, de maduración, de adecuación de mi mente para entender el mundo como una ciencia, me han servido para iniciarme en el mundo de la investigación, último fin de una tesis. Por tanto, ahora empieza mi verdadero camino, los años que han pasado han sido el entrenamiento para mi futuro investigador.

He tenido grandes maestros en este tiempo. El principal, D. Manuel Romero Gómez, que me envió a formarme fuera de Sevilla, prometiendo que me iba a esperar y así fue, al volver del máster realizado en Pamplona muchísimo más preparada para trabajar en un laboratorio de lo que me fui, me dio la oportunidad de formarme en este equipo.

También tengo mucho que agradecer a nuestro jefe de laboratorio, D. José Antonio del Campo, que además de dirigirme en la tesis, me ha servido de ejemplo, estimulando mi espíritu de superación. Agradecer además a todas las personas que forman y han formado parte de nuestro grupo, de todas y cada una de ellas he aprendido algo valioso. Gracias de corazón a todos porque aunque no os hayáis dado cuenta, siempre ha habido palabras y gestos que me han ayudado tanto en los buenos momentos, como en los no tan buenos.

A mi marido Antonio, no sólo marido sino también amigo, confidente, salvavidas, bastón de apoyo, animador incansable, también corregidor de tesis (siendo abogado), más amo de casa en los momentos que yo no podía ayudar, y un largo ect. Esto lo digo de corazón: sin ti nunca hubiera podido terminar la tesis. Muchísimas gracias Antonio, prometo ayudarte en tu futura tesis, que sé que lo estas deseando.

A mis padres, lo primero por darme la vida, la educación, la alegría, la confianza en mí misma que me han dado al confiar en mí siempre. Pero en concreto para estos momentos de realización de la tesis, ellos me han ayudado verdaderamente haciendo sacrificios, cuidando de Fernando siempre que he necesitado, escuchándome en los momentos buenos y en los complicados, leyéndose la tesis, apoyándome y dándome consejo. Mil gracias mamá y papá. A mis hermanos, a Fátima y a José Antonio, ellos también me han apoyado y ayudado, y sobre todo mejorado mi humor con una risoterapia al llegar al campo y disfrutar de las comidas familiares donde vuelan los "cuchillos" para meternos los unos con los otros. Me encanta mi familia, gracias a todos por ella.

Por último, pero no menos importante a mis amigos, a todos: los biólogos, los del máster, las de los pisos, los del parque, a mis familiares (incluyo los de Antonio) que son también amigos, la gente de la parroquia, mi Rocío del cole, a Esther, a Felipe y a Ángela, a Mariajo, Luis y a Julia... A todos por comprender mis ausencias y las de Antonio al tenerme que ayudar, y por el apoyo mostrado. Mil gracias de corazón.

Una mención especial, más bien muy especial: a mis Biologüitas, Ana, Ana Mari, Mari Carmen y Merchante, incluyo a Rafa también. Con ellas sí que me he desahogado ya que me entendían a la perfección al estar pasando por lo mismo que yo. Gracias por las risas y los

momentos de "odio" hacia los contratiempos de tesis, la empatía entre nosotras es mucho mayor de lo que se puede explicar y eso hacía que llegásemos a casa como nuevas y ya no estuviéramos abatidas sino preparadas para volver a luchar. Os echo mucho de menos chicas, sé que son importantes vuestras estancias pero no significa que no os eche de menos.

A mi hijo Fernando lo he dejado para el final, porque a él le quiero pedir perdón, he intentado estar contigo todo lo que he podido, compatibilizando al máximo el trabajo y la familia. Pero siempre tendré una duda en mi corazón: ¿Me has echado de menos en tus dos primeros años de vida?

# ÍNDICE



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	9
ÍNDICE.....	13
ABREVIATURAS.....	18
ÍNDICE DE FIGURAS .....	25
ÍNDICE DE TABLAS .....	33
A. INTRODUCCIÓN.....	42
A.1 HEPATITIS C Y RESITENCIA A LA INSULINA.....	42
A.1.1. HEPATITIS C. GENOTIPOS Y TRATAMIENTOS. ....	42
A.1.2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	44
A.1.2.1. PROTEINAS ESTRUCTURALES .....	46
A.1.3. CICLO VIRICO DE VHC.....	48
A.1.4. SISTEMA DE INFECCION IN VITRO .....	53
A.1.5. RESISTENCIA A LA INSULINA .....	53
A.1.6. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN LOS HEPATOCITOS .....	54
A.1.7. MODIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C .....	57
A.2. CARCINOMA HEPATOCELULAR INDUCIDO POR VIRUS DE LA HEPATITIS C. ....	61
A.2.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR Y TRATAMIENTOS. ....	61
A.2.2. VÍA DE SUPERVIVENCIA CELULAR DE PI3K/AKT/MTOR .....	62
A.3. METFORMINA Y SU USO EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS .....	66
A.3.1. METFORMINA Y HEPATITIS C.....	67
A.3.2. METFORMINA Y CARCINOMA HEPATOCELULAR .....	68
A.4. SIMVASTATINA Y SU EMPLEO EN SÍNDROME METABÓLICO Y HEPATITIS VIRALES.....	70
B. OBJETIVOS.....	75
C. MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
C.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA .....	79

C.2. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR .....	80
C.2.1. LÍNEAS CELULARES HUH7.5 Y HEPG2 .....	80
C.2.2 CULTIVO DE HEPATOCITOS PRIMARIOS.....	82
C.3. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES INFECCIOSAS .....	83
C.3.1. TRANSFECCION POR ELECTROPORACIÓN .....	83
C.4. TITULACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES.....	84
C.5. INFECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HUH7.5 CON EL REPLICON JFH1. ....	86
C.6. TRATAMIENTO CON METFORMINA, SIMVASTATINA, INTERFERON E INSULINA.....	86
C.7. ENSAYOS PARA DETERMINAR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LA METFORMINA Y LA SIMVASTATINA .....	87
C.7.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CON AZUL TRYPAN .....	87
C.8. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL CON TRISURE™ (BIOLINE).....	88
C.9. TRASCIPCIÓN INVERSA.....	88
C.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: PCR .....	89
C.11. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL MEDIO DE CULTIVO .....	90
C.12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES .....	92
C.13. INMUNODETECCION DE PROTEÍNAS: WESTERN-BLOT (INMUNOBLOT) .....	92
C.14. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS.....	93
D. RESULTADOS .....	97
D.1 ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	97
D.1.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE DE PACIENTES.....	97
D.1.2. MODIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS HUH7.5 INFECTADAS CON EL REPLICÓN JFH1. ....	98
D.1.3. MODIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS INFECTADAS POR INSULINA. ....	99
D.1.4. MODIFICACIÓN POR EL TRATAMIENTO CON METFORMINA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS INFECTADAS.....	100

D.1.4.1. DISMINUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL TRATAMIENTO CON METFORMINA....	102
D.1.5. MODIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS INFECTADAS TRATADAS CON INTERFERÓN. ....	104
D.2. EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y METFORMINA EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LÍNEAS DERIVADAS DE HEPATOCITOS.....	105
D.2.1 ESTUDIO SOBRE LA LÍNEA CELULAR HEPG2.....	105
D.2.1.1. CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR CON EL TRATAMIENTO DE METFORMINA, SIMVASTATINAS O CONJUNTAMENTE. ....	105
D.2.1.2. VARIACIONES DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR TRATADAS CON METFORMINA. ....	107
D.2.1.3. MODIFICACION DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR POR EL TRATAMIENTO CON SIMVASTATINA. ....	109
D.2.1.4. EXPRESION DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR POR EL TRATAMIENTO CONJUNTO CON METFORMINA Y SIMVASTATINA. ....	110
D.2.2. ESTUDIO SOBRE LA LÍNEA CELULAR HUH7.5 .....	112
D.2.2.1. VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA CELULAR HUH7.5 TRATADA CON METFORMINA, SIMVASTATINA Y AMBAS CONJUNTAMENTE. ....	112
D.2.2.2. VARIACIONES DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR EN LA LÍNEA CELULAR HUH7.5 TRATADA CON METFORMINA. ....	114
D.2.2.3. MODIFICACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR POR EL TRATAMIENTO CON SIMVASTATINA. ....	116
D.2.2.4. VÍA PI3K/AKT/MTOR TRATADAS CON METFORMINA Y SIMVASTATINA. ....	116
D.2.2.5. LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C INDUCE CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	118
D.2.2.6. DIFERENCIAS EN LA RUTA mTOR EN RESPUESTA A METFORMINA, PRODUCIDAS POR LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	118
D.2.2.7. EFECTO DE LA SIMVASTATINA EN LA RUTA mTOR. INTERACCIÓN CON LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C .....	120
D.2.2.8. EFECTO DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C SOBRE EL EFECTO ANTINEOPLÁSICO DE LA COMBINACIÓN DE LA SIMVASTATINA Y METFORMINA.....	120
D.2.2.9. EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y SU COMBINACION CON LA METFORMINA SOBRE EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.....	122

D.2.3 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTINEOPLÁSICA DE LA METFORMINA Y LA SIMVASTATINA EN HEPATOCITOS PRIMARIOS. ....	124
D.2.3.1 HEPATOCITOS PRIMARIOS TRATADOS CON METFORMINA. ....	124
D.2.3.2 HEPATOCITOS PRIMARIOS TRATADOS CON SIMVASTATINA.....	125
DISCUSIÓN.....	129
CONCLUSIONES .....	139
CONCLUSIONS .....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	145
ANEXO I: ARTÍCULOS.....	163
ANEXO II: APORTACIONES A CONGRESOS.....	189



## **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

- $\mu$ l: microlitro
- 4EBP1/eIF4: eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4 binding protein 1
- Acetil-CoA: Acetil coencimaA
- ADNc: ADN codificante
- AGL: Ácidos grasos libres
- AMP: Adenosín monofosfato
- AMP: Adenosín monofosfato
- AMPK: Proteín quinasa activada por AMP
- APOB: Apolipoproteína B
- APOCII: Apolipoproteína CII
- APOCIII: Apolipoproteína CIII
- APOE: Apolipoproteína E
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero.
- AS160: Sustrato de AKT de 160 KDa
- ATP/AMP: Adenosin trifosfato/ Adenosín monofosfato
- ATP: Adenosín trifosfato
- AVE: Aclaramiento viral espontaneo
- BAD: Proteína antagonista de Bcl2
- Bax: Proteína X asociada a Bcl-2
- Bcl-2: B-cell lymphoma 2
- B-RAF: Proteína homóloga de RAF B
- BSA: Albumina sérica bovina.
- C´ terminal: Carboxilo terminal
- CD81: Cluster de diferenciacion 81
- c-Kit: Proteína tirosina quinasa kit.
- CLDN1: Claudina 1
- Ct: Ciclo umbral (Threshold cycle)
- DCTN4: Subunidad 4 de dinactina.
- DEN: dietilnitrosamina
- DGAT1: Diacetilglicerol acetiltrasnferasa.
- DMEM: Medio esencial mínimo de Eagle (siglas en inglés)
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- dNTPs: Dioxidonucleotido
- EGF1: Factor de crecimiento epidérmico
- EGTA: ácido tetraacético etilenglicol (siglas en inglés)
- eIF-2 $\alpha$ : Factor de iniciación eucariota 2 $\alpha$
- ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares
- FasL: Ligando de FAS
- FBL2: F-box and leucine rich repeat protein 2 (siglas en ingles)
- GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- gDNAsa: Nucleasa del ADN genómico
- Glut2: Transportador de glucosa 2
- Glut4: Transportador de glucosa 4
- GS: Glucógeno sintetasa.
- GSK3: Glucógeno sintasa cinasa 3
- GTP: Guanosín trifosfato
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Agua oxigenada
- H<sub>2</sub>O-DEPC: Agua dietilpirocarbonato
- HCC: Carcinoma hepatocelular
- HDL: Lipoproteína de alta densidad
- HEPES: Acido hidroxietil piperazinil etanosulfónico.
- HLA: acrónimo inglés de Human leukocyte antigen
- HMG-CoA: Hidroximetilglutaril-coenzima A

- HMG-CoAR: Receptor de hidroximetilglutaril-coenzima A
- HOMA: Evaluación del modelo homeostático
- HR: Hazard ratio
- HRP: Horseradish peroxidase (siglas en ingles)
- HSPGs: Proteoglicanos de heparán sulfato.
- IFN: Interferón
- IGF1: Factor de crecimiento de insulina 1
- IGF2: Factor de crecimiento de insulina 2
- IGFBP3: Proteína de unión 3 al IGF.
- INF: Interferón
- INF- $\beta$ : Interferón  $\beta$
- iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible
- INS: Insulina
- IRES: Región interna de entrada al lugar ribosomal
- IRS1: Sustrato del receptor de insulina 1, *insulin receptor substrate 1*
- IRS2: Sustrato del receptor de insulina 2, *insulin receptor substrate 2*
- JFH1: Japanese fulminate hepatitis 1
- JNK: Jun N-terminal quinasa
- K2-EDTA: dipotasio-ácido etildiaminotetraacético
- KDa: KiloDalton
- Laboratorio P3: Laboratorio de Alta Seguridad Biológica Nivel 3
- LC3B: Light Chain 3B (siglas en inglés)
- LC3BI: Light Chain 3B I (siglas en inglés)
- LC3BII: Light Chain 3B II (siglas en inglés)
- LD: Gotas lipídicas, lipids droplets
- LDL: Lipoproteína de baja densidad
- LDLR: Receptor de LDL
- LKB1: Quinasa del hígado B1
- LPV: Lipoviropartículas
- mA: Miliamperios
- MAP3K: Proteína 3 Quinasa activada por mitógenos
- MAP3K: Proteína activada por mitógeno 3 quinasa, mitogen-activated protein kinase kinase kinase.
- MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
- MDM2: Mouse double minute 2 homolog (siglas en ingles).
- MEK: proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
- MET: Metformina
- mLST8: Proteína asociada a mTOR homologa a LST8.
- mM: miliMolar
- MO25: Mouse protein 25 (siglas en inglés)
- MTA: Acuerdo de transferencia de material.
- mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero, mammalian Target of Rapamycin.
- mTORC1: Complejo 1 de mTOR
- mTORC2: Complejo 2 de mTOR

- MTP: proteína microsomal de transporte de triglicéridos
- Myc: avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (siglas en inglés)
- n: Número total de datos
- N' terminal: amino terminal
- NAD/NADH: nicotinamida adenina dinucleótido oxidada/reducida
- NAFLD: Enfermedad del hígado graso no alcohólico (siglas en inglés)
- NFkB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- NR: No respondedor
- NS: No estructural
- NTPasa: Nucleósido trifosfatasa
- OCLN: Ocludina
- OCT1: Transportador de cationes orgánico.
- ORF: Marco de lectura abierto, open reading frame
- P: Valor de significación estadística
- p70S6K: p70S6 quinasa
- PA28γ: Activador de proteosoma 28 γ
- PARP: poli (ADP-ribosa)polimerasa
- PBMC: Células polimorfonucleares de sangre periférica
- PBS: Tampón fosfato salino
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Polymerase chain reaction
- PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PDK1: Quinasa dependiente de fosfoinositido 1.
- PDK2: Quinasa dependiente de fosfoinositido 2.
- PFK2: Fosfofructocinasa 2
- PI3K: Fosfatidilinositol 3 Quinasa
- PIP2: Fosfatidilinositol bifosfato
- PIP3: Fosfatidilinositol trifosfato
- PKB/AKT o AKT: Proteína quinasa B
- PKC: Proteína quinasa C
- PKR: Proteína quinasa R
- PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisoma.
- PRAS40: Proteína rica en prolina sustrato Akt de 40 KDa
- PTEN: fosfatidilinositol trisfosfato fosfatasa
- PTEN4: fosfatidilinositol trisfosfato fosfatasa 4
- PTP1B: Proteína tirosina fosfatasa 1B
- qPCR: PCR cuantitativa.
- R: Respondedor
- Raf-1: Acelerador rápido de fibrosarcoma celular
- Raptor: Proteína regulatoria asociada a mTOR
- RC: Respondedor completo
- RE: Retículo Endoplásmico
- RhebGTP: Proteína homóloga de Ras enriquecido en el cerebro, unida a GTP
- Rictor: Compañero de mTOR insensible a rapamicina
- RNasa: Ribonucleasa

- ROCK: Proteína quinasa asociada a Rho.
- RP6S: Proteína ribosomal S6
- RT-Buffer: Tampón de retrotranscripción
- RT-primers: Oligonucleotidos de retrotranscripción
- S: Simvastatina
- Ser: Serina
- SFB: Suero Bovino Fetal
- Sin 1: Proteína quinasa mamifera que interacciona por estrés 1.
- SIRT1: Sirtuina 1
- SOC: Supresor de la señalización de las citoquinas
- SR-BI: Receptor scavenger tipo BI
- STRAD1: Proteína 1 adaptadora específica de LKB1
- Tab: Tabla
- TCDI<sub>50</sub>: Dosis infecciosa que infectan al 50% de las células.
- TCTP1: translational controlled tumour protein 1 (siglas en ingles)
- Thr: Treonina
- TNF  $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$
- TSC1/2: Proteína esclerosis tuberosa 1 y 2
- TTBS: Tris-Buffer Salino y Tween 20
- U/UC: Uracilo/uracilo citosina
- UI: Unidades internacionales
- UTR: Región no traducida, untranslated region
- V: Voltios
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
- VEGFR-2: Receptor 2 del VEGF
- VHC: Virus de la hepatitis C
- VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad



## **ÍNDICE DE FIGURAS**





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de los genotipos del virus de la Hepatitis C.....	43
<b>Figura 2.</b> Esquema del virus de la hepatitis C.....	45
<b>Figura 2.</b> Organización genómica y proteica del VHC.....	45
<b>Figura 3.</b> Esquema de estructura y localización de las proteínas virales.....	48
<b>Figura 4.</b> Comparación entre una VLDL y una LVP.....	49.
<b>Figura 5.</b> Esquema de la entrada del VHC en los hepatocitos. 1. Uniones a los factores de fijación: GAG y LDLR. 2. Unión a los receptores de entrada: SRB1 y CD81. 3. Internalización mediada por clatrina activa por CLDN1 y OCLN1. 4. Liberación del VHC del endosoma temprano.....	50
<b>Figura 7.</b> Modelo de ensamblaje del VHC. El ensamblaje viral consta de tres módulos: core, el complejo E1E2p7NS2, y el complejo de replicación. Se realiza entre el microambiente membranoso de la gota lipídica (LD) y el retículo endoplásmico (RE). El resultado del ensamblaje es una lipovirionpartícula ya que MTP transfiere proteínas que hace que madure a una estructura parecida a VLDL. sER/mw: Retículo endoplásmico donde se ha formado la red membranosa donde se produce la replicación viral.....	52
<b>Figura 8.</b> Esquema de la vía de señalización de la insulina.....	56
<b>Figura 9.</b> Interferencias del VHC en la vía de señalización de la insulina.....	58
<b>Figura 10.</b> Interacción multiorgánica del virus de la hepatitis C. El tejido adiposo visceral aumenta la resistencia a la insulina en todo el cuerpo, inducida por el virus de la hepatitis C. TNF: Factor de necrosis tumoral, AGL: Ácidos grasos libres.....	59
<b>Figura 11.</b> La proteína core del VHC interfiere en la vía de señalización de la insulina degradando el sustrato del receptor de insulina (IRS-1) e induciendo resistencia a la insulina....	60
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática de la vía PI3K-AKT.....	64
<b>Figura 13.</b> Estructura molecular de la metformina: 1,1-Dimetilbiguanida, fórmula química: C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> .....	66

<b>Figura 14.</b> Esquema de la acción de la metformina en la célula.....	67
<b>Figura 15.</b> Esquema de la actuación de la metformina sobre el vía de señalización de la insulina. La metformina dejaría de activar a mTOR por lo cual el sustrato del receptor de insulina se volvería a activar en respuesta a la insulina.....	68
<b>Figura 16.</b> Estructura molecular de la simvastatina. Fórmula química: C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub> .....	71
<b>Figura 17.</b> Esquema de la interacción de la Lovastatina en la replicación viral. El uso de estatinas inhibiría a la HMG-CoA Reductasa y disminuiría la síntesis de Geranylgeranyl pirofosfato, disminuyendo el anclaje de FBL2 al retículo endoplásmico y por ende de NS5A del complejo de replicación del virus de la Hepatitis C.....	72
<b>Figura 18.</b> Detalle de la rejilla de la cámara de Neubauer.....	82
<b>Figura 29.</b> Niveles de expresión génica de la vía de señalización de la insulina en PBMC de pacientes no respondedores (NR) respecto a los respondedores (R) a la doble terapia contra la hepatitis C crónica.....	97
<b>Figura 20.</b> Cambios de expresión génica de la vía de señalización de la insulina producidos por la infección con el replicón JFH1.....	98
<b>Figura 21.</b> Modificaciones de la expresión proteica de la vía de señalización de la insulina producidas por la infección con JFH1.....	98
<b>Figura 22.</b> Modificación de la expresión génica de PTP1B por el tratamiento con insulina (INS0).....	99
<b>Figura 23.</b> Expresión proteica de la vía de señalización de la insulina en células Huh7.5 tratadas con insulina (INS) e infectadas con JFH1.....	99
<b>Figura 24.</b> Expresión génica de AKT, PTP1B, PTEN1 y TCTP modificada por la infección con JFH1 y el tratamiento con metformina (MET).....	100
<b>Figura 25.</b> Expresión proteica de la vía de señalización de la insulina en células Huh7.5 tratadas con metformina (MET) e infectadas con JFH1. <b>A</b> Imagen de Western-Blot. <b>B</b> Cuantificación del Western-Blot.....	101
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de partículas virales JFH1 en el medio de cultivo de células Huh7.5 tratadas con insulina (INS), metformina (MET) o interferón (INT).....	102

<b>Figura 27.</b> Porcentaje de ARN de polaridad negativa del virus de la hepatitis C en células infectadas con JFH1 tratadas con metformina (MET), insulina (INS) o interferón (INT).....	103
<b>Figura 28.</b> Expresión proteica de la proteína core del replicón JFH1 en células tratadas con metformina (MET), insulina (INS) o interferón (INT).....	103
<b>Figura 29.</b> Expresión génica de la vía de señalización de la insulina en células infectadas por JFH1 y tratadas con interferón (INT).....	104
<b>Figura 30.</b> Curva de viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratadas con metformina (M) a diferentes dosis: M1:0.5mM, M2:2mM, M3: 10mM.....	105
<b>Figura 31.</b> Curva de viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratadas con simvastatina (S) a diferentes dosis: S1:1µM, S2: µM, S3: 4µM.....	106
<b>Figura 32.</b> Curva de viabilidad celular de la línea HepG2 tratada con una combinación de simvastatina (S: 2 µM) y metformina (2mM).....	107
<b>Figura 33.</b> Expresión génica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con metformina (M 2mM) cuantificadas mediante qRT-PCR.....	108.
<b>Figura 34.</b> Expresión proteica de la vía mTOR de células HepG2 tratadas con metformina 2mM (M).....	108
<b>Figura 35.</b> Expresión génica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina 2µM (S).....	109
<b>Figura 36.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina 2µM (S) cuantificadas mediante Western-Blot.....	109
<b>Figura 37.</b> Expresión génica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina (S 2µM) y metformina (2mM).....	110
<b>Figura 38.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina (S 2µM) y metformina (M 2mM).....	110
<b>Figura 39.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina (S 2µM), metformina (M 2mM) o la combinación de ambas (SM, S: 2µM y M:2mM).....	111

<b>Figura 40.</b> Viabilidad celular de la línea Huh7.5 tratada hasta 72 horas con diferentes concentraciones de metformina M1: 0,5mM, M2: 2mM, M3: 10mM.....	112
<b>Figura 41.</b> Curva de viabilidad celular en la línea celular Huh7.5 tratadas con simvastatina (S) a diferentes dosis: S1:1μM, S2: μM, S3: 4μM.....	113
<b>Figura 42.</b> Curva de viabilidad celular de la línea Huh7.5 tratadas conjuntamente con simvastatina 2μM y metformina 2mM, hasta 72 horas.....	114
<b>Figura 43.</b> Expresión génica de la vía mTOR en células Huh7.5 tratadas con metformina 2mM (M) durante 72 horas.....	115
<b>Figura 44.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en células Huh7.5 tratadas durante 72 horas con metformina 2mM (M).....	115
<b>Figura 45.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en células Huh7.5 tratadas con simvastatina 2μM durante 72 horas.....	116
<b>Figura 46.</b> Expresión génica de la vía mTOR en células Huh7.5 tratadas con la combinación de simvastatina 2μM y metformina 2mM.....	117
<b>Figura 47.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en células de la línea Huh7.5 tratadas con simvastatina (2μM) y metformina (2mM).....	117
<b>Figura 48.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en células Huh 7.5 tratadas con simvastatina (S 2μM), metformina (M 2mM) o la combinación de ambas (SM, S: 2μM y M:2mM).....	118
<b>Figura 49.</b> Expresión génica de la vía mTOR de células infectadas por JFH1 y tratadas con metformina (2mM) durante 72 horas.....	119
<b>Figura 50.</b> Western-blot de las proteínas de la vía mTOR en células Huh7.5 infectadas por el replicón JFH1 y tratadas con metformina.....	119
<b>Figura 51.</b> Western-blot de las proteínas de la vía mTOR en células Huh7.5 infectadas por el replicón JFH1 tratadas con simvastatina.....	120
<b>Figura 52.</b> Expresión génica de la vía mTOR en la línea celular Huh7.5 en células infectadas con JFH1, y tratadas con la combinación de simvastatina y metformina.....	121

<b>Figura 53.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en la línea celular Huh7.5 en células infectadas con JFH1 y tratadas con la combinación de simvastatina y metformina cuantificada mediante western-blot.....	121
<b>Figura 54.</b> Porcentaje de disminución del virus producido en el medio de cultivo de las células infectadas por JFH1 tratadas con simvastatina 2µM, metformina 2mM y su combinación, cuantificado mediante PCR COBAS® Taqman® HCV test v2.0. Para control positivo se ha utilizado células infectadas y tratadas con interferón (INT).....	122
<b>Figura 55.</b> Disminución de la cantidad de ARN viral de polaridad negativa en células Huh7.5 tratadas con simvastatina 2µM, metformina 2mM y su combinación, medida por qPCR. Para control positivo se ha utilizado células infectadas y tratadas con interferón (INT).....	123
<b>Figura 56.</b> Western-blot de la proteína core del JFH1 en células Huh7.5 tratadas con simvastatina 2µM, metformina 2mM y su combinación.....	123
<b>Figura 57.</b> Gráfica representativa de la disminución de la TCDI <sub>50</sub> del medio de cultivo procedente de células infectadas con el replicón JFH1 y tratadas con los diferentes tratamientos de simvastatina (SIMV), metformina (MET) y la combinación de ambos (SIMV-MET) medida mediante inmunohistoquímica hacia core.....	124
<b>Figura 58.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en hepatocitos primarios procedentes de diferentes pacientes (enumeración), tratados con metformina 2mM (MET).....	125
<b>Figura 59.</b> Expresión proteica de la vía mTOR en hepatocitos primarios procedentes de diferentes pacientes (enumeración), tratados con simvastatina 2µM (SIMV).....	126



# ÍNDICE DE TABLAS





## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla B1. Resumen de las características de los pacientes no respondedores (NR) y respondedores (R) a interferón pegilado y ribavirina.....	79
Tabla B2. Relación de los oligonucleótidos utilizados en el estudio.....	90
Tabla B3. Relación de los anticuerpos utilizados en el estudio.....	93



## **SUMMARY**



## Introduction

Hepatitis C virus (HCV) induces insulin resistance (IR) and steatosis. It frequently ranges from chronic infection to liver cirrhosis and, ultimately, hepatocellular carcinoma (HCC). The molecular mechanisms that bind viral infection with IR have not been well established. Therefore, it is necessary to study how metabolic pathways are modified by HCV. Insulin activates AKT/mTOR survival pathway, and these changes may contribute to HCC progression. Metformin, a commonly used oral anti-hyperglycemic agent, improves the SVR rate to peginterferon and ribavirin. Furthermore, several studies show that metformin treatment reduced the HCC incidence, suggesting that this drug prevents HCC development among diabetic patients. Likewise, simvastatin, an anti-dyslipidemia agent, reduces the HCC risk in cirrhotic patients. The role of simvastatin in HCC risk may be relevant because of the close relationship between HCV virus cycle and lipids metabolism.

## Aims

1. To analyze the insulin signaling pathway modifications produced by Hepatitis C virus, and the effects of insulin, metformin and interferon  $\alpha$  2a treatments in this pathway, using an *in vitro* model. To analyze the effect of metformin on viral infection.
2. To investigate the role of metformin and simvastatin in HCV infection and in HCC development using an *in vitro* model, based on cell culture and human primary hepatocytes, focused on mTOR pathway genes and proteins.

## Material and methods

Blood samples were collected from genotype 1 Hepatitis C infected patients treated with peg-interferon  $\alpha$  2a and ribavirin (10 patients with sustained virological response and 10 non responder patients) after obtaining written consent. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used to isolate RNA for quantifying insulin signaling pathway gene expression.

HepG2 and Huh7.5 cells were grown in supplemented DMEM culture medium at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Infective particles of JFH-1 were added to growing cells at 1 particle/cell rate, and insulin, metformin, interferon  $\alpha$  2a or simvastatin treatment were added 3 hours after cell

seeding. At 96 hours cells were collected to determine the cell viability by the Neubauer chamber or to isolate the total RNA or proteins. Gene and protein expression were quantified by qRT-PCR and Western-Blot respectively. To calculate  $TCID_{50}$  of JFH1, culture medium was recovered from the 96 hours treated cells, and used to infect new cells previously seeded. At 48 hours post-infection, cells were fixed for viral titration by immunohistochemistry against core virus protein.

Human hepatocytes were prepared from liver biopsies obtained from 5 donors submitted to a surgical resection of a liver tumor after obtaining patients written consent. Hepatocytes isolation was based on the two-step collagenase procedure. Hepatocytes were pooled and seeded at confluence on type I collagen-coated dishes and maintained in a supplemented DMEM-Ham-F12:William's E (1:1) medium for 12 h. Afterward, the medium was removed and replaced with a fresh culture medium supplemented, when indicated, with metformin 2mM or simvastatin 2 $\mu$ M. At 72 hours cells were collected to determine the cell viability or to isolate the total RNA or proteins. Gene and protein expression were quantified by qRT-PCR and Western-Blot respectively.

## Results

Hepatitis C virus modifies the insulin signaling pathway both *in vivo* and *in vitro*; by gene expression up-regulation in PBMC of genotype 1 patients, or by inhibition of PTEN (-1.61 $\pm$ 0.17 fold) together with mTOR and TCTP up-regulation (1.61 $\pm$ 0.13 and 2.19 $\pm$ 0.9 fold respectively) in Huh7.5 cells infected with JFH1 replicon.

Insulin treatment in infected cells further reduced PTEN levels (-1.9 $\pm$ 0.5 fold) and decreased AKT protein (-1.47 $\pm$ 0.25 fold),

Metformin on JFH1 infected cells reduced mTOR, PTEN, AKT, PTP1B and TCTP (-2.16 $\pm$ 0.36, -1.4  $\pm$  0.17, -1.96  $\pm$  0.14, -1.64  $\pm$ 0.2 and -1.92 $\pm$  0.19 fold respectively), but increased IRS1 (1.4 $\pm$ 0.14 fold). Metformin also inhibited hepatitis C viral replication (55% $\pm$ 26.6), core protein (-5.9 $\pm$ 0.4 fold) medium viral production (83.29% $\pm$ 1.04) and  $TCID_{50}$  (-9.9 $\pm$ 3.4 fold).

Simvastatin and metformin treatment inhibited cell proliferation *in vitro* in a dose-dependent manner in HepG2 and Huh7.5 cells. Simvastatin inhibited mTOR protein (HepG2: -2.5 $\pm$ 0.3, Huh7.5: -2.16 $\pm$ 0.36 fold) while metformin, besides inhibiting mTOR, also inhibited

PTEN (HepG2:  $-2.56 \pm 0.53$ , Huh7.5:  $-1.4 \pm 0.17$  fold) and PTP1B (HepG2:  $-1.84 \pm 0.39$ , Huh7.5:  $-1.64 \pm 0.2$  fold).

Simvastatin and metformin combination in HepG2 cells decreased cell viability, while in Huh7.5 this synergic effect was not observed. However, in Huh7.5 cells, drugs combination inhibited both mTOR and TCTP ( $-2.56 \pm 0.89$ ,  $-1.89 \pm 0.39$  fold) and activated the tumor suppressor PTEN ( $2.08 \pm 0.61$  fold).

Both drugs affected similarly to cells infected with JFH1, inhibiting mTOR and TCTP, but increased PTEN up to control level. LC3B, an autophagy marker, was found increased after metformin treatment in JFH1 infected cells (LC3BII:  $5.0 \pm 2.8$  fold). In addition, LC3B and Caspase 3 increased after metformin treatment in primary hepatocytes (LC3BII:  $4.05 \pm 2.56$ , Caspase 3:  $5.64 \pm 4.2$  fold). A synergic effect was observed by drugs combination in the viral replicative cycle.

### Conclusions

1. Hepatitis C modulates insulin signaling pathway *in vivo* and *in vitro* through mTOR, TCTP and PTEN. Metformin inhibits hepatitis C viral cycle *in vitro*.
2. Metformin and simvastatin inhibit cell proliferation and HCV replication *in vitro*, decreasing levels TCTP (oncogene) and increasing PTEN (tumor suppressor). Furthermore, metformin increased the amount of LC3B, a marker for autophagy. Simvastatin and metformin could contribute to the prevention of and therapy for hepatocellular carcinoma.





# **INTRODUCCIÓN**

# A. INTRODUCCIÓN

## A.1 HEPATITIS C Y RESISTENCIA A LA INSULINA

### A.1.1. HEPATITIS C. GENOTIPOS Y TRATAMIENTOS.

La hepatitis crónica C es una enfermedad que afecta al 3% de la población mundial (170 millones de personas). Está causado por el virus de la hepatitis C (VHC), descubierto en 1989, aunque anteriormente ya había sido descrito como un proceso viral al que se denominó hepatitis no A no B<sup>1</sup>.

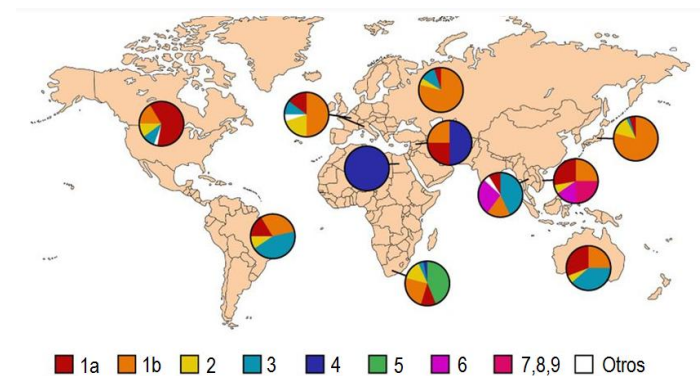
La hepatitis es un proceso inflamatorio del hígado con diferentes orígenes etiológicos: exposición a tóxicos, inmunitario, metabólico o infeccioso. Las hepatitis tóxicas pueden ser provocadas por fármacos, venenos o agentes químicos; las hepatitis inmunitarias son causadas por alteraciones en el sistema inmune o anomalías en el HLA tipo II de la superficie de los hepatocitos; las hepatitis metabólicas suelen ser isquémicas o esteatohepatitis no alcohólica; y las hepatitis infecciosas son producidas tanto por los agente infecciosos como: virus, bacterias, amebas o parásitos, o por sus productos, por ejemplo las toxinas bacterianas.

Las hepatitis víricas tienen una mayor prevalencia, y están provocadas por diferentes tipos de virus, llamados por orden alfabéticos desde la A hasta la G, causando mayores problemas de salud pública las hepatitis crónicas B y C. El virus de la hepatitis C se transmite principalmente por vía parenteral, siendo las posibles vías de trasmisión: las transfusiones sanguíneas (realizadas durante la década de 1980 y menos frecuentes a partir de 1992), consumo de drogas por administración vía venosa o intranasal, trasplante de órganos, transmisión vertical, hemodiálisis e intervenciones quirúrgicas entre otras.

En el momento de la infección el VHC puede ser eliminado por el sistema inmune, llamándose a este fenómeno aclaramiento viral espontaneo (AVE), este hecho sólo ocurre en el 15-20% de los casos. Cuando el sistema inmune no es capaz de eliminar el VHC, la infección se cronifica, causando daño hepático que puede derivar en esteatosis, fibrosis hepática, cirrosis (10-30%) y hepatocarcinoma (1-5%) en un periodo de 20 a 30 años<sup>2</sup>.

El VHC infecta principalmente a los hepatocitos donde se desarrolla la enfermedad, pero también puede infectar a las células de Kupffer, a las células endoteliales y a las células mononucleares de la sangre (tanto monocitos como linfocitos B y T)<sup>3</sup>.

Existen 6 genotipos mayoritarios de hepatitis C, que a su vez se dividen en subtipos y quasiespecies. Se denominan genotipos a aquellos genomas cuyo grado de homología se encuentra entre el 66-69%; se designan con un número arábigo y, hasta el momento, se han descrito 11 genotipos distintos, 6 de ellos mayoritarios. Dentro de un mismo genotipo, cuando el grado de homología se encuentra entre el 77-80% se habla de subtipo; estos se designan con una letra, que seguirá al número que nombra al genotipo; hasta la fecha se han descrito más de 100 subtipos distintos. Dentro de un mismo subtipo, se denomina quasiespecie a aquellos genomas en los que el grado de homología no es superior al 91-95%<sup>4</sup>. Los distintos genotipos se distribuyen geográficamente de manera diferente, siendo predominantes en Europa los genotipos 1, 2 y 3 (Fig. A 1).



**Figura 6.** Distribución geográfica de los genotipos del virus de la Hepatitis C.

Desde el año 1998 hasta 2012, el tratamiento estándar contra el virus de la hepatitis C consistió en la combinación de ribavirina con interferón pegilado  $\alpha$  2a (IFN). La eficacia global de este tratamiento fue del 50% de curación, siendo más eficaz ante los genotipos 2 y 3. Sin embargo, sólo del 30-50% de los pacientes infectados con el genotipo 1b, genotipo más común en Europa, respondieron al tratamiento<sup>5</sup>. Además, en un 36% de los pacientes<sup>6</sup>, los tratamientos producían efectos secundarios, como anemia macrocítica, depresión, alteraciones intestinales, malestar, fatiga, y dolor de cabeza y muscular<sup>7</sup>. En 2012, salieron al mercado nuevos tratamientos contra la hepatitis C, como el Telaprevir y Boceprevir, inhibidores directos de la proteasa viral NS3, con los cuales se alcanzaron mayores porcentajes de curación, entre un 25-30% más de respuesta. Las limitaciones principales de estos fármacos fueron su uso no pangnotípico (solo destinado a genotipo 1) y un mayor índice de efectos

adversos, siendo más severos y frecuentes<sup>3</sup>. Por otro lado, la gran tasa de mutación de VHC facilitó la aparición de quasiespecies resistentes al tratamiento<sup>8</sup>.

En el año 2015 se ha comercializado la segunda generación de inhibidores de proteasas, siendo mucho más eficaces que los anteriores pues alcanzan una tasa de respuesta virológica sostenida de entre el 90 y 100% incluso en pacientes cirróticos (anteriormente difíciles de curar)<sup>9</sup>. Además, disminuyen los efectos secundarios, teniendo una buena tolerancia a los tratamientos ya que son libres de peginterferón, aunque en muchos casos se sigue añadiendo ribavirina (añadir ribavirina está indicado en pacientes cirróticos, con experiencia previa con inhibidores de proteasas, o para genotipos 2 y 3). Los tratamientos se han acortado en el tiempo considerablemente, de 48 semanas con peginterferon y ribavirina, pasaron a 24 semanas con la primera generación de proteasas, pero pueden llegar a acortarse hasta las 8 semanas con la segunda generación, aunque la media son 12 semanas de tratamientos<sup>9</sup>.

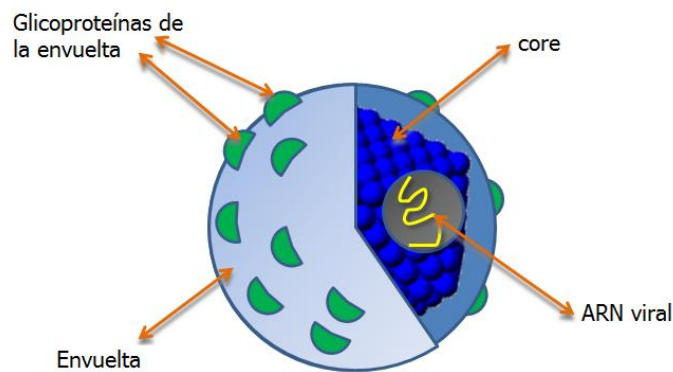
Los nuevos tratamientos se prescriben en combinación, según las características del paciente, teniendo en cuenta fundamentalmente el genotipo del virus, el grado de fibrosis y si anteriormente fue un no respondedor a inhibidores de proteasas de primera generación. Los fármacos que actualmente están en el mercado son el simeprevir, sofosbuvir, daclatasvir, ledipasvir y la combinación de ombitasvir, paritaprevir, ritonavir y dasabuvir<sup>10</sup>.

Los altos costes de los nuevos fármacos hacen que haya una fuerte selección entre los pacientes que se pueden tratar, prescribiéndose solo en pacientes con alta fibrosis. Por todo ello, sería necesario encontrar nuevos tratamientos eficaces de menor costo o el uso de coadyuvantes que mejoren la respuesta al tratamiento estándar.

### **A.1.2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

El virus de la hepatitis C (VHC) pertenece a la familia *Flaviviridae*, única especie del genero *Hepacivirus*. La partícula viral está asociada a las lipoproteínas, constituyendo un complejo llamado lipoviropartículas, formado por la nucleocápsida viral rodeada de una membrana lipídica. Dentro de la nucleocápsida se encuentra el genoma viral, que está formado por una hebra de ARN de polaridad positiva, de aproximadamente 9.600 nucleótidos. El ARN se traduce produciendo una poliproteína que se procesa para originar las proteínas

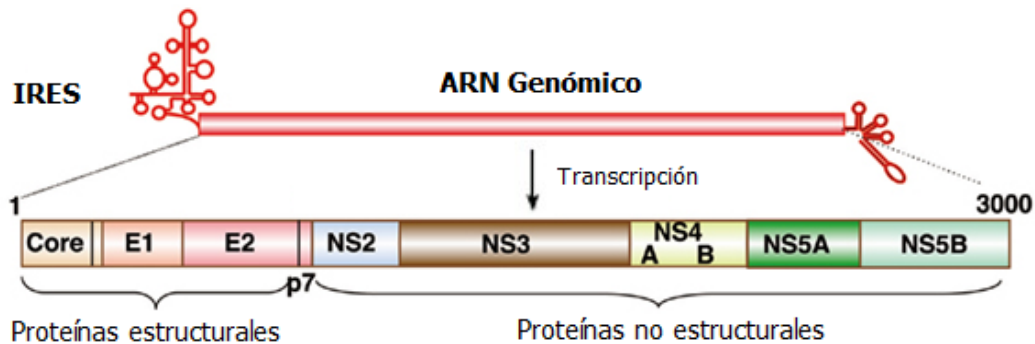
estructurales del virus: Core, E1, E2 y p7; y las no estructurales: NS2, NS3, NS4 A y B, NS5 A y B<sup>11</sup>.



**Figura 2.** Esquema del virus de la hepatitis C

El ARN viral tiene una única pauta de lectura abierta (*Open Reading Frame, ORF*) flanqueadas por estructuras secundarias en los extremos 5' y 3' UTR (*Untranslated Region, UTR*). La región 5'UTR es una de las zonas más conservadas del genoma viral y está formada por cuatro dominios con una longitud de 340 bases. Los dominios esenciales para la replicación del virus son el I y el II, mientras que los dominios II, III y IV constituyen la región interna de entrada del ribosoma (*Internal Ribosome Entry Site, IRES*) para empezar el proceso de traducción de ARN<sup>12</sup>.

La región 3'UTR de unos 200 nucleótidos, contiene tres tipos de estructuras y es esencial para la replicación del virus. Se divide en una región hipervariable de 40 nucleótidos, seguido por un tramo poliU/UC y termina con una cola 3' muy conservada. La región hipervariable difiere entre los genotipos descritos, pero dentro del mismo genotipo está muy conservada<sup>13</sup>.



**Figura 7.** Organización genómica y proteica del VHC<sup>14</sup>.

El virus de la hepatitis C tiene una sola pauta de lectura abierta que codifica a una poliproteína de 3.000 aminoácidos, la cual se co-traduce y procesa post-transcripcionalmente, por proteasas del virus, así como del propio huésped. Esta poliproteína madura se divide en tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) situadas en el extremo N-terminal, un canal iónico (p7), y seis proteínas no estructurales (NS2, NS3A, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) situadas en el extremo C-terminal. Las proteínas estructurales son procesadas por peptidasas celulares, usando para ello señales peptidasas similares al del huésped. Las proteínas no estructurales son procesadas por dos proteasas virales esenciales para la replicación del virus<sup>11</sup>.

#### A.1.2.1. PROTEINAS ESTRUCTURALES

Core es conocida por formar la cápsida viral. Tras un proceso de maduración alcanza un peso molecular de 21 KDa. El extremo C-terminal se ancla a la superficie de las gotas lipídicas o *lipid droplets* (LD) donde se produce el ensamblaje viral. El extremo N-terminal de core es muy básico y está implicado en el proceso de ensamblaje del ARN y su homo-oligomerización, ambas propiedades muy importantes de las proteínas de la nucleocápsida<sup>15</sup>.

E1 y E2 son proteínas localizadas en la envuelta lipídica responsables de la unión a los receptores celulares y de la entrada del virus en la célula. Una vez internalizado el virus, los extremos C-terminales dirigen el virus al retículo endoplásmico (RE). Son proteínas muy glicosiladas que forman un heterodímero por uniones no covalentes<sup>11</sup>.

La proteína p7 es un péptido hidrofóbico de 63 aminoácidos. Ambos extremos, C- y N-terminal, están dentro de la luz del retículo endoplásmico, lo que indica que tienen dos dominios transmembrana que forman poros hidrofóbicos, actuando como canales iónicos. Es esencial p7 en la producción de virus infecciosos por ser imprescindible para el ensamblaje de la partícula de VHC<sup>16</sup>.

#### A.1.2.2. PROTEINAS NO ESTRUCTURALES

NS2 es una proteína trasmembrana de 21-23 KDa, unida por el extremo N-terminal a la membrana del RE, y con actividad proteasa en el extremo C-terminal. La mitad C-terminal de NS2 contiene un dominio de proteasa que, junto con el dominio de la proteasa N-terminal de NS3, forma una proteasa catalíticamente activa que escinde la unión NS2/NS3<sup>17</sup>.

NS3 (69 KDa) contiene dos actividades enzimáticas. El tercio N-terminal de NS3 es una serina proteasa, que escinde todas las uniones de las proteínas NS posteriores (uniones NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A y NS5A/NS5B), con la ayuda de NS4A como cofactor. Sus dos tercios C-terminal, contienen una ARN helicasa/ NTPasa que desenrolla sustratos de ARN-ARN de manera dependiente de ATP, y tiene un papel potencial en la resolución de estructuras secundarias durante la replicación del ARN. Recientemente se ha publicado que la helicasa NS3 puede participar en una etapa temprana del ensamblaje viral<sup>18</sup>.

Tanto la proteasa y la actividad helicasa son importantes para la replicación del VHC. Además, la actividad de la proteasa de NS3-NS4A juega un papel importante en la capacidad del VHC para inhibir la inmunidad innata mediante la inhibición de la señalización antiviral mitocondrial, la inhibición de la producción de IFN- $\beta$ <sup>19</sup>, y la inhibición del reclutamiento de caspasas. Por tanto, la proteasa NS3-NS4A disminuye la capacidad de la célula huésped para activar una respuesta antiviral frente a la infección por el VHC<sup>20</sup>.

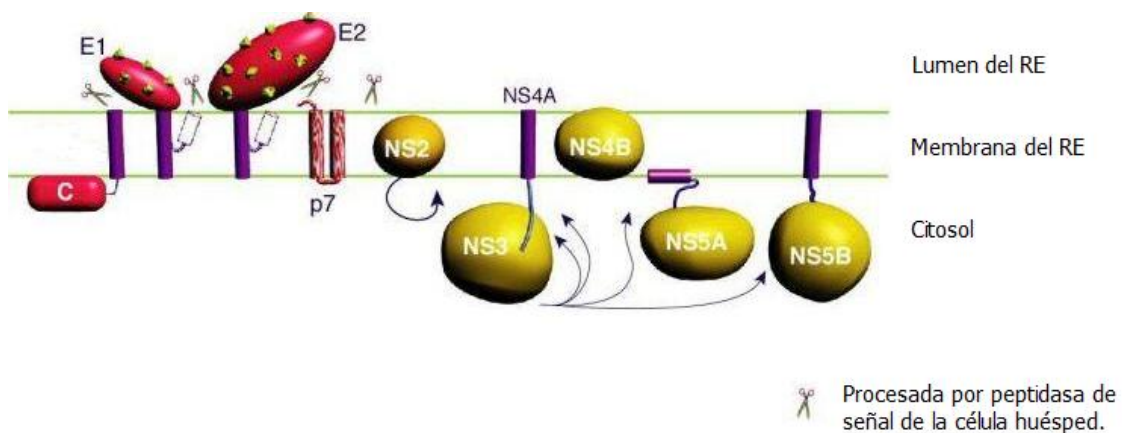
NS4A es un polipéptido de 54 aminoácidos, cofactor de la proteasa NS3. La región N-terminal de NS4A sirve para anclar al complejo NS3-NS4A a las membranas intracelulares, mientras la región central de NS4A (aminoácidos 21-34) es requerida para la activación de NS3. La región C-terminal juega un papel fundamental en la replicación del VHC mediante la regulación de la fosforilación de NS5A<sup>17</sup>.

NS4B es una proteína de membrana de 27 KDa que contiene tanto un dominio transmembrana hidrófobo, como hélices anfipáticas. Su función más conocida es la formación de un compartimento de membrana especializada llamada "red membranosa", donde se lleva a cabo la replicación del ARN<sup>21</sup>. La región C-terminal de NS4B contiene un sitio de unión de GTP, pero el mecanismo por el que la unión de GTP facilita la replicación del VHC sigue siendo desconocido<sup>22</sup>.

NS5A es una zinc-metaloproteasa que se encuentra unida a la membrana de los LD por una hélice anfipática N-terminal. Está conformado por otros tres dominios: el primero de ellos está muy conservado y permite que la NS5A se una al ARN viral; los otros dos dominios son más pequeños, el segundo está implicado en la replicación viral y el tercero en el ensamblaje del virus<sup>23</sup>. NS5A se fosforila de dos maneras: una forma basalmente fosforilada de 56 KDa y otra hiperfosforilada de 58 KDa. Varios estudios evidencian un papel importante en el estado

de fosforilación de NS5A en la replicación viral, siendo las condiciones más favorables para la replicación aquellas en las que NS5A está menos fosforilada<sup>17</sup>.

NS5B (68 KDa) es la ARN polimerasa dependiente de ARN, responsable de la síntesis de la cadena negativa complementaria del genoma viral, que actúa como plantilla para la síntesis de la cadena positiva. Existe una interacción funcional entre NS5A y NS5B, y la función de NS5A es servir como cofactor para NS5B. La ARN polimerasa dependiente de ARN no posee mecanismo de corrección de errores, y por tanto producen mutaciones que originan la multitud de quasiespecies<sup>24,25</sup>.



**Figura 8.** Esquema de estructura y localización de las proteínas virales<sup>26</sup>.

### A.1.3. CICLO VIRICO DE VHC.

El ciclo replicativo del VHC se puede diferenciar en varias etapas: a) entrada del virus en la célula, b) descapsidación en el citoplasma c) traducción del ARN viral y procesamiento de la poliproteína por proteasas, d) replicación viral, e) ensamblaje, maduración del virión y liberación de la célula huésped.

#### A.1.3.1. ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA

La entrada viral es el primer paso de la interacción entre el virus y la célula huésped que conducen a una infección productiva. La entrada del VHC se cree que es un proceso altamente



orquestado que implica tanto factores virales como celulares del huésped, siendo por tanto un proceso muy complejo<sup>27</sup>.

Las partículas de VHC circulan en suero asociadas a diferentes moléculas como las inmunoglobulinas o diferentes lipoproteínas. Mayoritariamente, el virus está asociado a lipoproteínas de baja (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), llamándose a este complejo lipovirpartículas (LVP)<sup>28</sup>. Las LVP son estructuras como las lipoproteínas, compuestas por triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol y apolipoproteínas: ApoB, ApoE, ApoCII y ApoCIII, junto con la envuelta glicoproteica del virus (core, E1 y E2). Esta asociación con las lipoproteínas supone algunas ventajas, como la utilización de receptores lipoproteicos para la entrada de éstas<sup>29</sup>.

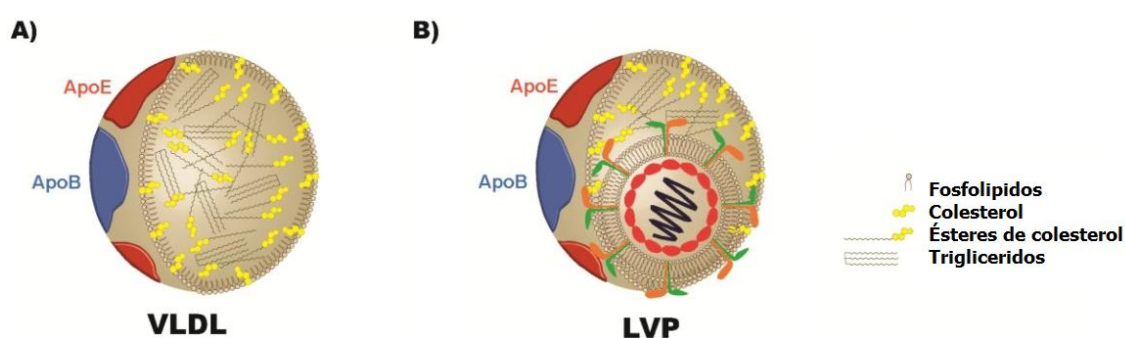


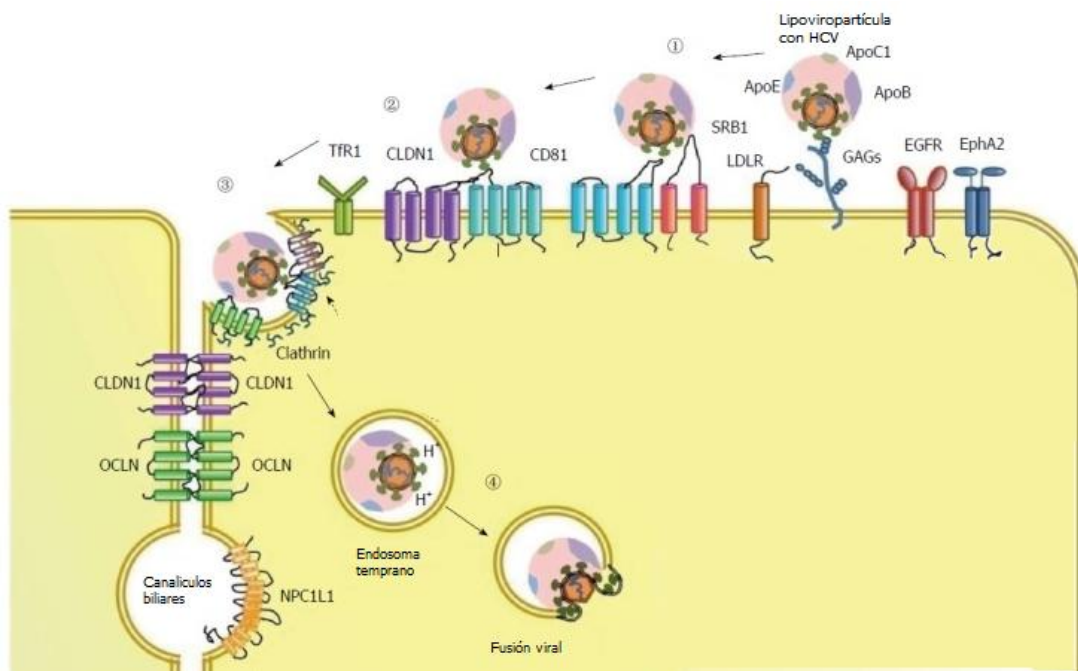
Figura 9. Comparación entre una VLDL y una LVP.

La entrada del virus se inicia por la unión a factores de fijación, lo que ayuda a concentrar los virus en la superficie celular. En el espacio de Disse, la apoE y la región hipervariable de E2 de las partículas de VLDL interactúan con los proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs) en la superficie basolateral de los hepatocitos, siendo el primer sitio de acoplamiento para la fijación inicial del VHC<sup>30</sup>. Posteriormente, puede unirse al receptor LDL (LDLR), por vía apoE, responsable del transporte de colesterol<sup>31</sup>. Después de la unión inicial a la célula huésped, el virus generalmente se une a factores específicos de entrada, para el VHC se conocen varios receptores en la superficie celular.

El primer factor de entrada del VHC es SR-BI (scavenger receptor clase B type I), que interacciona tanto con la glicoproteína E2 del virus, como con las VLDL, y podría actuar concomitantemente con CD81. SR-BI es un receptor multiligando que facilita la transferencia de lípidos al hepatocito, principalmente las lipoproteínas de alta densidad (High-density lipoprotein, HDL)<sup>28</sup>. Después de la interacción con SR-BI, la tetraspanina CD81 interactúa con la

glicoproteína de la envuelta E2 en una etapa muy temprana de la entrada del virus, llevando a cabo un cambio conformacional en E1/E2 de la envuelta glicoproteica, que facilita la fusión dependiente de la disminución del pH (para la descapsidación) y la endocitosis vía clatrina del virus<sup>32</sup>. El complejo VHC-CD81 activa señales para su movimiento lateral por la membrana hasta las áreas de unión célula a célula<sup>33</sup>. CD81 se relaciona con muchas funciones celulares como la adhesión, morfología, proliferación y diferenciación.

Las uniones estrechas mantienen la polaridad de las células, permitiendo el paso de los lípidos pero no de las proteínas transmembranas y así, a cada lado, poseen funciones diferentes. Las proteínas de uniones estrechas Claudina 1 (CLDN1) y Ocludina (OCLN) también se relacionan con la entrada del virus en el hepatocito. La CLDN1 no interactúa con ninguna de las glicoproteínas víricas, pero si interacciona con CD81, sin embargo, la OCLN si interacciona con la glicoproteína E2, pero todavía no está claro que pueda interactuar indirectamente con CD81/CLDN1. Estas proteínas están envueltas en una etapa posterior en la entrada del virus después de SR-BI y CD81. La envuelta glicoproteica del VHC promueve la endocitosis por medio de CD81 y CLDN1 por la vía de las clatrina<sup>34</sup>.



**Figura 10.** Esquema de la entrada del VHC en los hepatocitos. 1. Uniones a los factores de fijación: GAG y LDLR. 2. Unión a los receptores de entrada: SRB1 y CD81. 3. Internalización mediada por clatrina activa por CLDN1 y OCLN. 4. Liberación del VHC del endosoma temprano<sup>29</sup>.

#### **A.1.3.2. LIBERACIÓN AL CITOPLASMA Y DESCUBRIMIENTO DEL ARN VIRAL**

Después de la endocitosis mediada por receptores, la acidificación del compartimento por el paso de endosoma a lisosoma, hace que las glicoproteínas E1 y E2 cambien conformacionalmente, lo que activa la fusión de la membrana del virus con el endosoma, liberando la nucleocápsida desnuda al citosol<sup>35</sup>.

#### **A.1.3.3. TRADUCCIÓN DEL ARN VIRAL Y PROCESAMIENTO DE LA POLIPROTEINA POR PROTEASAS**

La traducción del ARN viral se lleva a cabo en el RE rugoso, a través del IRES en la región 5'UTR de la cadena positiva de ARN viral, y se inicia de manera independiente de caperuza, pero utilizando la maquinaria celular. Como se mencionó anteriormente, la traducción del VHC produce una poliproteína, que se procesa por peptidasas celulares y proteasas virales (NS2, NS3/4A) para generar 10 proteínas virales individuales, Core, E1 y E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B.

#### **A.1.3.4. REPLICACION DEL ARN, ENSAMBLAJE Y EMPAQUETAMIENTO.**

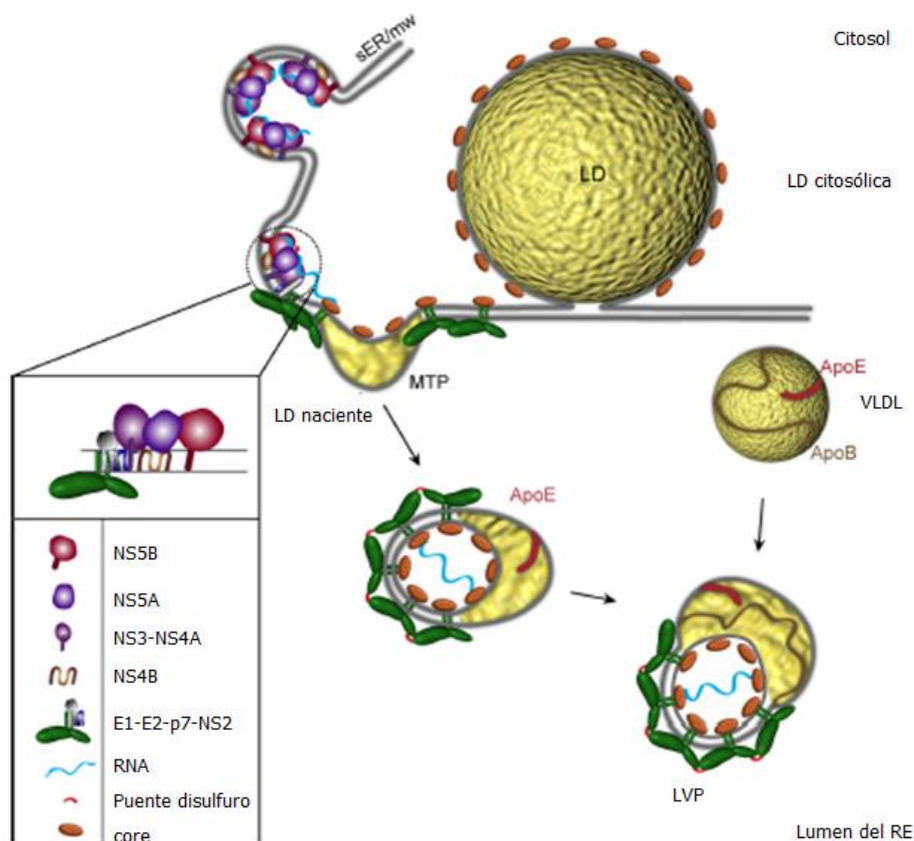
En el curso del procesamiento de la poliproteína, se produce un lugar llamado "red membranosa" donde las proteínas del VHC se asocian, llevando a cabo su función. Esta red membranosa está formada por vesículas de doble membrana que contienen proteínas no estructurales del VHC, ARN del VHC, membranas del RE y LD. La red membranosa en células infectadas parece ser inducida por NS4B, y posiblemente en combinación con NS5A<sup>36</sup>. Es el lugar donde la replicación del ARN viral se lleva a cabo con el genoma de ARN de cadena positiva como plantilla para la RdRp de NS5B, que genera la cadena negativa (un intermediario replicativo para producir los genomas de sentido positivo). Los nuevos genomas de ARN de cadena positiva se pueden traducir adicionalmente para producir nuevas proteínas virales, servir como plantilla, o ensamblarse a viriones infecciosos<sup>37</sup>.

#### **A.1.3.5. ENSAMBLAJE, MADURACIÓN DEL VIRIÓN Y LIBERACIÓN DE LA CELULA HUESPED.**

El ensamblaje de VHC se inicia en las proximidades de las LD. Las proteínas p7 y NS2 junto con la proteína celular diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1), interaccionan para transportar core desde el RE al LD. La proteína core al asociarse a los LD induce la

redistribución de estos desde el citoplasma a la región perinuclear, donde el ARN viral se está replicando en la red membranosa. Esta redistribución crea un microambiente donde las proteínas estructurales y no estructurales interactúan. Core se asocia al LD y al RE, y esta asociación de core con los LD es esencial para el reclutamiento de las otras proteínas virales, de hecho NS2, NS5A, E2 y E1 se colocan muy cerca de los LD, al igual que las cadenas positivas y negativas de ARN viral. La fosforilación de NS5A en el dominio III es esencial para el ensamblaje y la interacción core NS5A, y probablemente marca el inicio del ensamblaje<sup>38</sup>.

Es poco conocido lo que ocurre cuando el complejo de replicación se encuentra con las proteínas estructurales. El ARN viral es transportado desde la NS5A y el complejo de replicación hasta el virión por la *Tail interacting Protein* (TIP47), uniéndose a la cápsida de core por ser una proteína básica<sup>39</sup>. Las ApoB y ApoE al unirse a los LD formarían las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), pero al unirse al complejo de LD-virus se forman las lipoviripartículas (LVP). Las proteínas ApoE y ApoB se transfieren a los LD por medio de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP), conformando una VLDL madura que según los pocos hallazgos descritos, será secretada al torrente sanguíneo por la vía de excreción de lipoproteínas VLDL<sup>40</sup>.



**Figura 7.** Modelo de ensamblaje del VHC. El ensamblaje viral consta de tres módulos: core, el complejo E1E2p7NS2, y el complejo de replicación. Se realiza entre el microambiente membranoso de la gota lipídica (LD) y el retículo endoplásmico (RE). El resultado del ensamblaje es una lipoviripartícula ya que MTP transfiere proteínas que hace que madure a una estructura parecida a VLDL. sER/mw: Retículo endoplásmico donde se ha formado la red membranosa donde se produce la replicación viral<sup>28</sup>.

#### A.1.4. SISTEMA DE INFECCION IN VITRO

Después de un arduo esfuerzo, la comunidad científica ha encontrado un sistema de infección *in vitro* del virus de la hepatitis C que pudiera replicar. Sólo ha sido posible a través de un replicón viral llamado JFH1, clonado a partir del suero de un paciente japonés con hepatitis fulminante de genotipo 2a, y por un sistema de cultivo de la línea celular de carcinoma hepatocelular humano Huh7.5 completamente permisivo a la replicación de VHC, ya que el replicón JFH1 tiene una fuerte dependencia de su replicación por las células. Este sistema de infección, nos proporciona un ambiente que nos permite estudiar las condiciones fisiológicas que se están produciendo en el hígado de paciente<sup>41</sup>.

El chimpancé es el único modelo animal capaz de ser infectado por el VHC, desarrollando infecciones permanentes y presentando manifestaciones clínicas e histopatológicas similares a las de los humanos. Sin embargo, el uso de este modelo presenta elevados inconvenientes como el coste económico y las infraestructuras de los laboratorios, unido a la prohibición en Europa de la experimentación con estos animales<sup>42 43</sup>.

#### A.1.5. RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina es un desorden metabólico que se caracteriza por un estado de hiperinsulinemia para mantener los niveles de glucosa correctos, y si es una situación mantenida en el tiempo, puede producir: *Diabetes Mellitus* tipo II, obesidad, hipertensión, y/o enfermedades cardiovasculares<sup>44</sup>. El virus de la hepatitis C favorece la aparición de resistencia a la insulina y esteatosis, las cuales predicen una peor respuesta al tratamiento convencional. Además, las personas infectadas con hepatitis C tienen una probabilidad 3 veces mayor de padecer *Diabetes Mellitus* tipo II que las personas sanas<sup>45</sup>.

La insulina es una hormona que se sintetiza en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, y se encarga de regular la homeostasis de la glucosa en sangre junto a la hormona glucagón. Estas dos hormonas tienen una acción contrapuesta, la insulina activa la introducción y metabolismo de la glucosa en la células (principalmente anabolismo), mientras que el glucagón produce la salida de la glucosa almacenada desde las células hasta el torrente sanguíneo. Por tanto, la insulina se sintetiza cuando los niveles de glucosa son altos en sangre, y el glucagón cuando los niveles de glucosa son bajos<sup>46</sup>.

La insulina tiene diversos efectos en el organismo, producidos principalmente en los órganos diana: hígado, músculo y tejido adiposo.

1. Estimula la glucogenogénesis.
2. Inhibe la glucogenolisis.
3. Disminuye la glucosecreción hepática.
4. Promueve la glucólisis.
5. Favorece la síntesis de triacilgliceroles (al acelerar la glucólisis aumenta la producción de Acetil-CoA, precursor de los triglicéridos).
6. Estimula la síntesis de proteínas.

#### **A.1.6. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN LOS HEPATOCITOS**

La excreción de la insulina hacia el torrente sanguíneo hace que ésta pueda ser captada por las células diana que tienen el receptor de la insulina en sus membranas, activándose la vía de señalización de la insulina.

La vía de señalización de la insulina se inicia cuando esta hormona se une al receptor de insulina. Este es un receptor extracelular acoplado a una enzima con actividad tirosina quinasa. Está formado por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ . Las subunidades  $\beta$  se insertan en la membrana celular y se unen por puentes disulfuro a las dos subunidades  $\alpha$  que se encuentran en el lado extracelular de la membrana, a su vez, estas se encuentran ancladas entre sí por enlaces disulfuro<sup>47</sup>.

Al llegar la insulina a la célula a través del torrente sanguíneo, se une a la subunidad  $\alpha$  produciendo un cambio conformacional, que impulsa la actividad quinasa de las subunidades  $\beta$ <sup>48</sup>. La actividad quinasa, provocando la autofosforilación del receptor en los residuos de tirosina, permite que las proteínas sustratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1 y 2) se unan a él, activándose éstas a su vez. Las proteínas IRS activan varias vías de señalización. Una de ellas, a través de las proteínas fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y AKT, activando el metabolismo de la glucosa, la translocación del transportador de glucosa a la membrana

plasmática (Glut2 en el hígado y Glut4 en otros tejidos), la síntesis de ácidos grasos, proteínas y glucógeno<sup>49</sup>. IRS también promueve la supervivencia celular a través de la vía MAP3K<sup>50</sup>.

La proteína PI3K es un complejo formado por dos subunidades, una reguladora p85 que inhibe a otra subunidad catalítica p110. IRS1 al fosforilarse genera un sitio de unión para p85, que deja de ejercer la inhibición sobre p110. Por tanto, p110 puede ejercer su función y fosforilar al fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2), convirtiéndolo en fosfatidilinositol 3,4,5, trisfosfato (PIP3)<sup>51</sup>.

La función de los fosfolípidos como mensajeros, consiste en permitir el anclaje de proteínas enzimáticas, normalmente citosólicas, a la membrana plasmática y así pueden interactuar con sus sustratos y fosforilarlos. De este modo, PIP3 va a reclutar a tres seríntreonina quinasas citosólicas a la membrana plasmática, como las quinasas dependientes de fosfoinositidos 1 y 2 y la proteína quinasa B o también llamada AKT (PDK1, PDK2 y PKB/AKT)<sup>52</sup>.

Las PDK1 y PDK2 unidas a la membrana plasmática van a fosforilar a AKT/PKB en los aminoácidos Tre308 y Ser473<sup>52</sup>. Las fosforilaciones permiten la autofosforilación de AKT, lo que la activa y la hace independiente de fosfolípidos, disociándose de la membrana plasmática y viajando al citosol, al núcleo o a otros orgánulos para fosforilar proteínas diana.

Además, PDK1 fosforila algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC), entre ellas la isoforma PKC $\lambda/\zeta$ , que fosforila vesículas intracelulares que contienen el transportador de glucosa GLUT2, lo que resulta en la migración y fusión de las vesículas con la membrana plasmática. Esta migración se activa también por medio de AKT, la cual inhibe a AS160, incrementándose el tráfico-dependiente de Rab-GTP (activo) de GLUT2 a la membrana plasmática<sup>53</sup>.

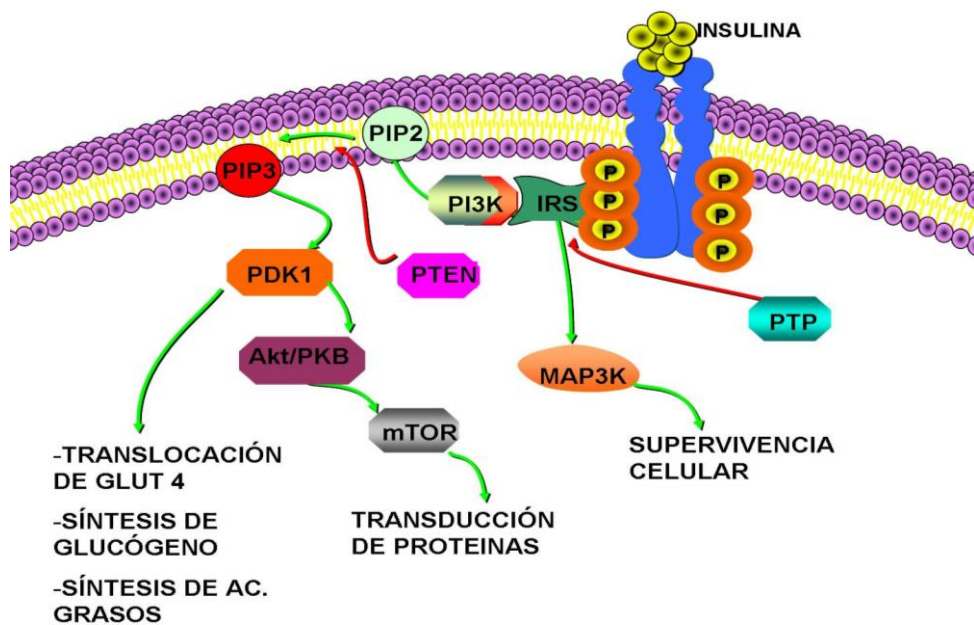
Existen tres isoformas de Akt (Akt1-3), de las cuales, la isoforma 2 parece ser la que juega un papel importante en la incorporación de glucosa inducida por la insulina<sup>54</sup>. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de una larga lista de sustratos, que propagan la respuesta a esta hormona como: la enzima glucógeno sintasa (GS), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la fosfofructocinasa 2 (PFK2), la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (factor de transcripción CREB), la proteína diana de rapamicina en células de mamífero (mamalian target rapamycin o mTOR), la caspasa 9 y la proteína antiapoptótica antagonista de Bcl2 (BAD)<sup>55, 56</sup>.

Entre estos sustratos destaca la fosforilación e inactivación de la enzima GSK3, una quinasa que inhibe a la glucógeno sintasa; la inhibición de GSK3 por Akt favorece la activación de la glucógeno sintasa y el aumento en la síntesis de glucógeno. La cascada de la PI3K incluye a otras quinastas de serina que median la respuesta de la insulina, incluyendo a mTOR, la cual regula la síntesis proteica a través de las vías de p70S6K/S6 y 4EBP1/eIF4<sup>56</sup>.

Para cesar la señal de la insulina y controlar el proceso, existen entre otros, dos inhibidores principales de la vía: PTP1B que inhibe a IRS1, y PTEN que impide la formación de fosfatidilinositol 3 fosfato producto de PI3K.

La proteína fosfatasa de tirosina 1B se encuentra relacionada con la resistencia a la insulina y disminuye la señal de esta hormona cuando está sobreexpresada. PTP1B disminuye los niveles de fosforilación en las tirosinas del receptor de insulina, disminuyendo la incorporación de glucosa en tejidos<sup>57</sup>.

La fosfatasa homóloga de la tensina (PTEN), desfosforila a la PIP3 en la posición 3', generando fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato, por lo que desfosforila los productos de la actividad PI3K. Ello conlleva que la cascada de activación no continúe, ya que no hay sitios de anclaje para las proteínas PDK y AKT<sup>52</sup>.



**Figura 8.** Esquema de la vía de señalización de la insulina.



### A.1.7. MODIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

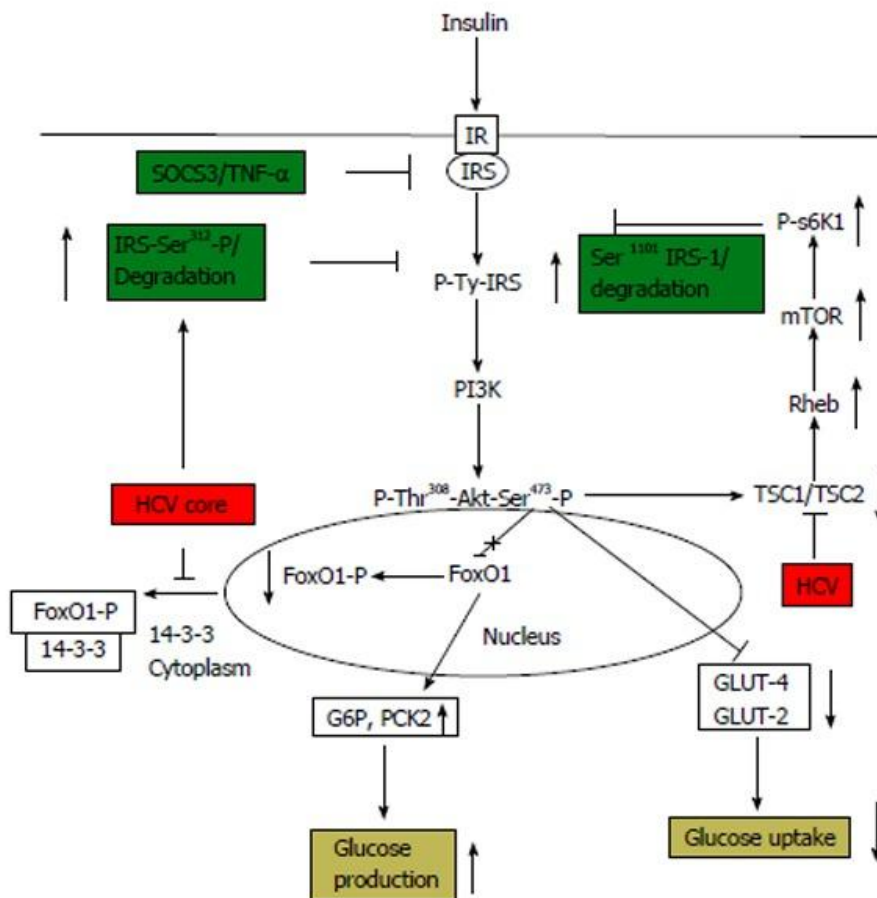
Existe una relación entre la resistencia a la insulina y la hepatitis C, ya que en pacientes con hepatitis C crónica, la resistencia a la insulina es más frecuente que en personas sanas de igual edad, sexo y peso, y se correlaciona con la progresión a esteatosis y fibrosis<sup>58</sup>. Además, la resistencia a la insulina induce un descenso en la tasa de respuesta sostenida al tratamiento con peginterferón alfa más ribavirina en pacientes con hepatitis C crónica, siendo un factor predictivo de respuesta<sup>59</sup>. La infección por el virus C produce resistencia a la insulina bloqueando la señal intracelular de esta hormona.

Cuando la insulina no es capaz de inducir la entrada de glucosa en la célula, las células beta-pancreáticas incrementan la producción de esta hormona, induciendo un estado de hiperinsulinemia, evitándose la hiperglucemia. De este modo, la resistencia a la insulina depende de la secreción y de la sensibilidad a la misma. La secreción de insulina aumenta cuando la sensibilidad a ésta disminuye, siendo la relación entre ambos eventos hiperbólica en vez de lineal. Así, la concentración de insulina es usualmente alta de forma temprana en la diabetes tipo 2<sup>60</sup>.

Dependiendo del genotipo viral, la interacción del virus en la vía de señalización de la insulina es diferente. En biopsias de pacientes infectados por VHC, no diabéticos, hay una disminución de la fosforilación en residuos de tirosina de IRS1, que hace disminuir su actividad y por tanto no activa la vía PI3K-AKT. Ratones transgénicos que expresan core genotipo 1, producen resistencia a la insulina por el aumento de SOC-3, que produce la ubiquitinación de IRS1 y 2. En genotipo 1 también se ve un aumento de mTOR, que hace que aumente la fosforilación en residuos de serina de IRS1y disminuya la fosforilación en residuos tirosina, haciendo que éste se inactive y se degrade. Además, a través del activador de proteosoma dependiente de 28y (PA28y) se produce una disminución de IRS2<sup>61</sup>.

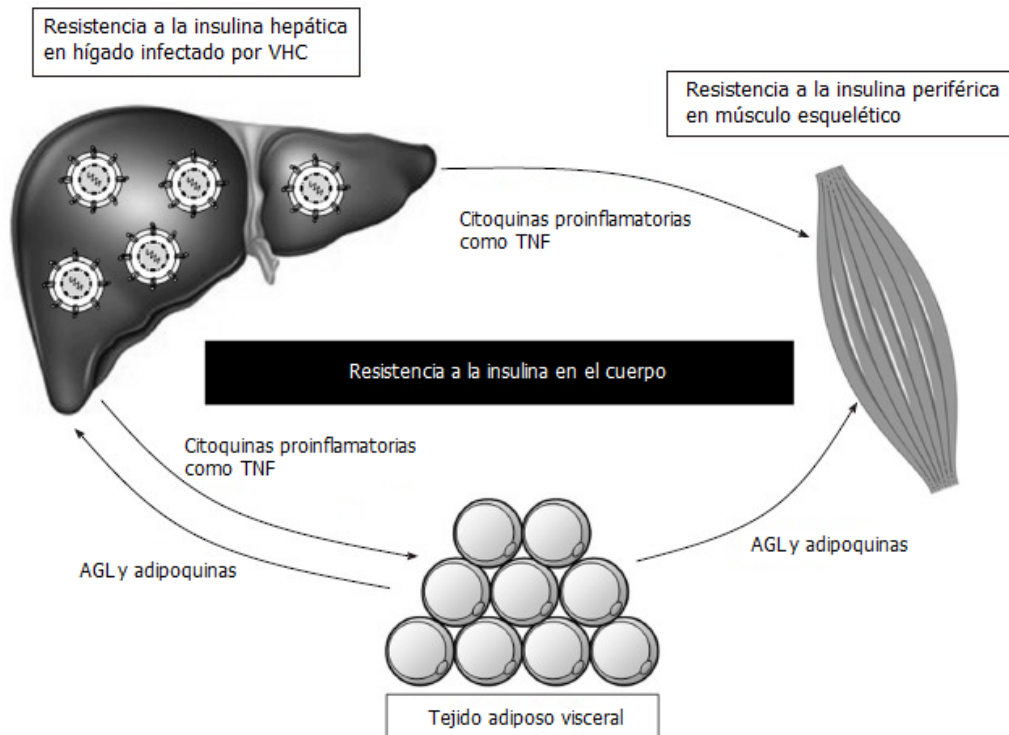
El genotipo 2 produce un aumento de JNK, que causa un aumento de las fosforilaciones en residuos de serina y una disminución en las fosforilaciones de residuos de tirosina de IRS1<sup>61</sup>. Esta activación también se ha visto con core genotipo 1. En genotipo 2 se ha observado una disminución en TSC1/2, que produce la activación de mTOR y S6K1, aumentando la fosforilación en las Ser 302 y 1.101 de IRS1, que causa la degradación de esta última<sup>3</sup>. Sin

embargo, en genotipo 3 la resistencia a la insulina se produce a través de MTP, el cual disminuye PPAR y aumenta SOC-7, que vuelve a generar una degradación de IRS1<sup>61</sup>.



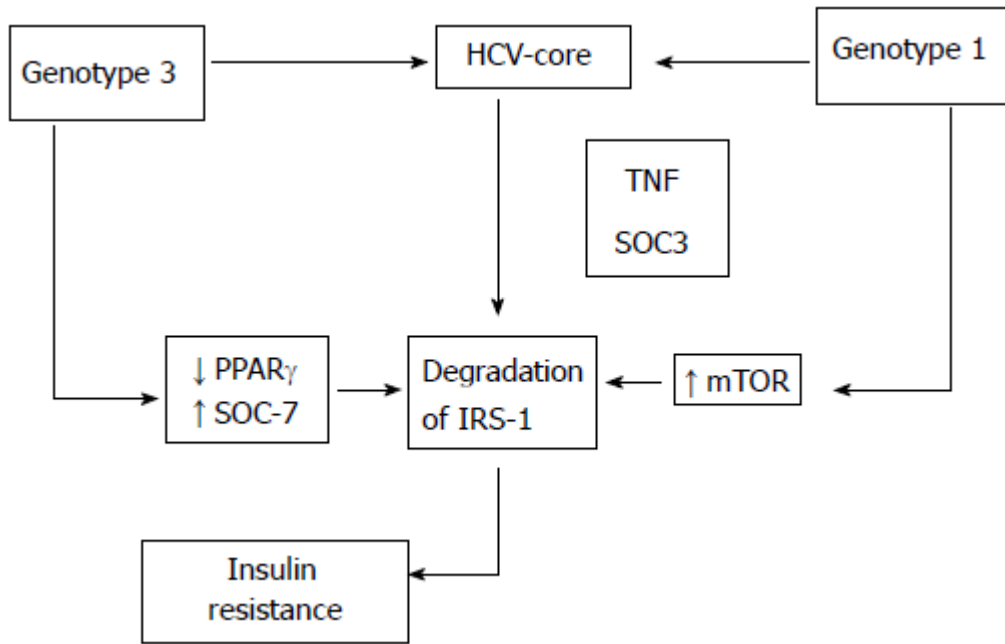
**Figura 9.** Interferencias del VHC en la vía de señalización de la insulina<sup>3</sup>.

Además, core también produce un aumento de la expresión de TNF alfa en la célula, haciendo que aumente la fosforilación en los residuos de serina en IRS1<sup>3</sup>. Los niveles de TNF- $\alpha$  en pacientes con hepatitis C crónica, están asociados con la resistencia a la insulina hepática y sistémica, así como con el desarrollo de diabetes. TNF- $\alpha$  parece jugar un papel importante en la aparición de obesidad relacionada con la resistencia a la insulina por VHC<sup>61</sup>.



**Figura 10.** Interacción multiorgánica del virus de la hepatitis C. El tejido adiposo visceral aumenta la resistencia a la insulina en todo el cuerpo, inducida por el virus de la hepatitis C. TNF: Factor de necrosis tumoral, AGL: Ácidos grasos libres<sup>61</sup>.

En resumen, el balance entre las fosforilaciones de Ser/Thr de IRS-1 hace que ésta esté activa (fosforilaciones en residuos de tirosina) o inactiva y se degrade (residuos de serina). Las fosforilaciones en residuos de serina es un mecanismo de retroalimentación negativo, que en condiciones fisiológicamente normales hace que prevenga una acción constante de la insulina. En condiciones de resistencia a la insulina hay un desequilibrio hacia las fosforilaciones de serina, que impide la activación de la vía completa. La proteína core induce resistencia a la insulina por el aumento de las fosforilaciones de los residuos Ser<sup>312</sup> y Ser<sup>1101</sup> de IRS1, inhibiendo su asociación al receptor de insulina, y siendo marcada para su degradación por la vía mTOR/S6K1 activo, y por tanto bloqueando la fosforilación de AKT en Thr<sup>308</sup> e inhibiendo la entrada de glucosa al hepatocito<sup>3</sup>.



**Figura 11.** La proteína core del VHC interfiere en la vía de señalización de la insulina degradando el sustrato del receptor de insulina (IRS-1) e induciendo resistencia a la insulina<sup>62</sup>

## A.2. CARCINOMA HEPATOCELULAR INDUCIDO POR VIRUS DE LA HEPATITIS C.

### A.2.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR Y TRATAMIENTOS.

El carcinoma hepatocelular (HCC) es el sexto cáncer más común y la tercera causa más frecuente de muerte por cáncer, con una incidencia anual de más de 700.000 personas en el mundo<sup>63</sup>. El factor de riesgo más frecuente es la cirrosis, que puede estar producida por diferentes causas como alcoholismo, hepatitis B y C, enfermedades autoinmunes del hígado, hemocromatosis, etc. Las hepatitis B y C pueden producir cáncer incluso en ausencia de cirrosis. En Europa la tasa de HCC consecuencia de la infección por VHC es del 70%. La diabetes es un factor de riesgo independiente en el desarrollo de HCC, y la tasa de muerte es cinco veces mayor en pacientes con un índice de masa corporal mayor de 40<sup>64</sup>. La tasa de supervivencia global es muy baja, de un 12% en 5 años.

Existen gran variedad de tratamientos disponibles, pero su uso depende del estado del hígado del paciente. Al ser la mayoría de los pacientes cirróticos, no hay tantas opciones terapéutica, ya que los mejores tratamientos requieren un mayor grado de función hepática y tamaño del tumor pequeño.

Los tratamientos actuales:

1. La resección hepática es la terapia de elección para aquellos pacientes con buena función hepática y un único tumor de pequeño tamaño (>3cm) en el hígado. Sólo una minoría de los pacientes con HCC son candidatos a resección. La supervivencia a los 5 años es > 60%, la desventaja es la alta tasa de recurrencia superior al 50% en 2 años.

2. El trasplante hepático requiere ciertas condiciones, que tengan una lesión de menos de 5cm o no más de tres lesiones y siendo cada una de ellas menores de 3cm. La supervivencia de los trasplantados es comparable a la supervivencia de trasplantados sin HCC. Se suelen hacer terapias puente como la quimioembolización. A los 4 años, la supervivencia global es del 85% y una supervivencia libre de recurrencia del 93%. Sin embargo, el trasplante de hígado es una terapia limitada por la falta de disponibilidad de órganos.

3. La ablación por radiofrecuencia aplica calor local mediante una aguja con corrientes alterna de alta frecuencia, produciendo necrosis tumoral. Se aplica en pacientes no candidatos

a resección ni a trasplantes, que todavía presentan buena función hepática. La tasas de respuesta son similares a las de la resección hepática en estadios tempranos de HCC (50-70% de supervivencia a los 5 años).

4. Quimioembolización o inyección de sustancias quimioterápicas y agente embolizante por vía intra-arterial hepática. Mejora la supervivencia a dos años, aunque la tasa de respuesta completa es del 40%, porque tiene un elevado grado de recurrencia y progresión de la enfermedad<sup>65</sup>.

5. Terapias sistémicas para estadios avanzados de la enfermedad con afectación vascular o lesión extrahepática. Tanto la quimioterapia como la radioterapia han demostrado tener una efectividad muy limitada contra el HCC. El sorafenib (Nexavar®) aumentó la mediana de supervivencia global: 10,7 meses en el grupo de sorafenib comparado con los 7,9 meses en el grupo placebo (P <0,001). El Sorafenib es un inhibidor multiquinasa oral con actividad contra Raf-1, B-RAF, VEGFR-2, PDGFR y receptores c-Kit<sup>64</sup>.

La mayoría de los enfermos con HCC han sido pacientes con riesgo, al ser cirróticos por las causas anteriormente citadas. El 90% de los casos de HCC presentan previamente una enfermedad crónica en el hígado o cirrosis, como es el caso de los pacientes infectados con VHC<sup>64</sup>. Estos enfermos tienen pocas alternativas de tratamiento al estar su función hepática muy alterada.

### **A.2.2. VÍA DE SUPERVIVENCIA CELULAR DE PI3K/AKT/MTOR**

El hígado es el mayor regulador del metabolismo en el cuerpo, y la vía mTOR es clave en el metabolismo celular. Esta vía integra señales de crecimiento celular, metabólicas, mitogénicas e inhibitoras de la apoptosis, por tanto, juega un papel muy importante en la resistencia a la insulina, en la Diabetes tipo II, la adipogénesis, la angiogénesis y el desarrollo tumoral<sup>66</sup>.

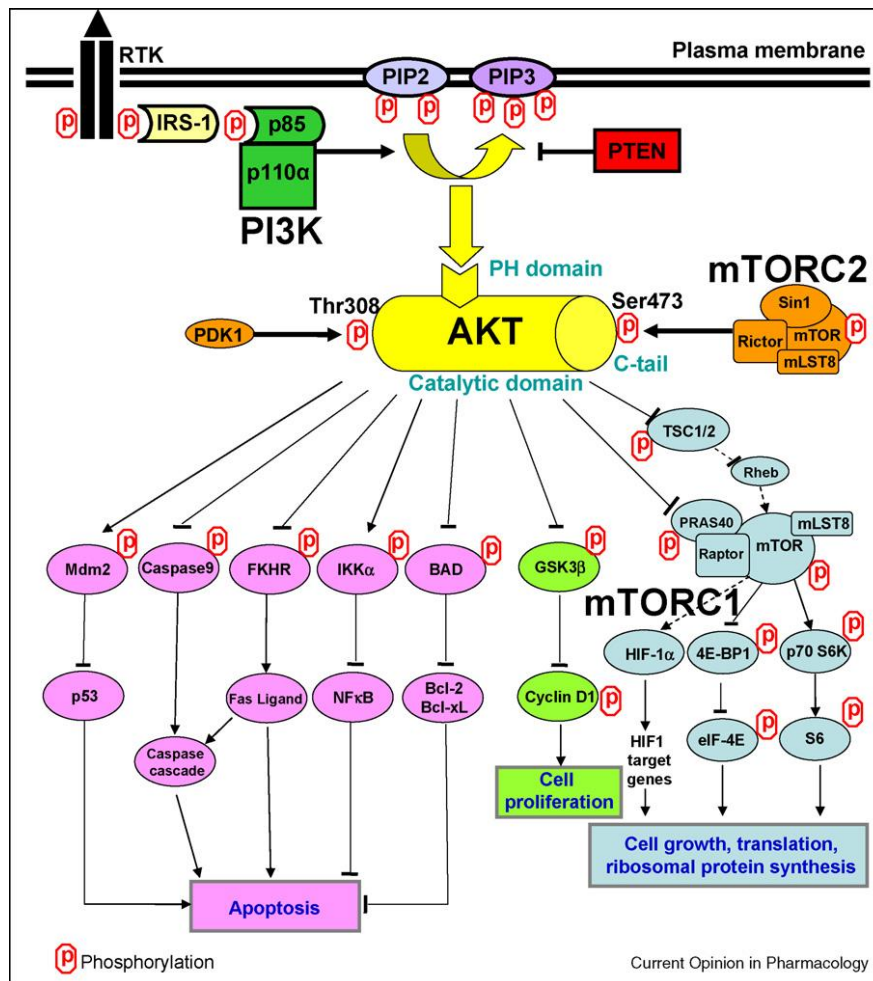
La activación de la vía mTOR no solo ocurre por la acción del receptor de la insulina, ya que esta vía PI3K/AKT/mTOR es compartida por muchos receptores tirosina quinasa, cuyos ligandos son muy variados, como el factor de crecimiento parecido a insulina 1 y 2 (insulin like grown factor 1 and 2, IGF1 & IGF2), el factor de crecimiento endotelial (VEGF) o el factor de

crecimiento epidérmico 1 (EGF1), entre otros<sup>67</sup>. La activación de esta vía ya ha sido descrita anteriormente para definir los efectos en el metabolismo, pero no se han descrito los efectos en supervivencia celular.

AKT además de activar a mTOR es capaz de inactivar señales proapoptóticas, como Bad, Procaspasa-9, factor de necrosis tumoral (TNF), p53 y el factor de transcripción de la familia Forkhead, que induce la expresión de factores pro-apoptóticos, como ligando-Fas (FasL). Por otro lado, activa al factor de supervivencia celular NFkB. Finalmente, sobre la regulación del ciclo celular, inhibe a p21, p27, Raf-1 (miembro de las MAPK) y aumenta la ciclina D1, dejando que progrese la fase G1/S<sup>68</sup>.

AKT activa a mTOR de manera indirecta. Éste normalmente está inhibido por TSC2, la activación de AKT produce su fosforilación y pérdida de función, lo que deja libre a Rheb GTP para fosforilar y activar a mTOR.

mTOR está formado por dos complejos distintos: mTORC1 y mTORC2. El complejo mTORC1 es sensible a la rapamicina y está formado por mTOR, Raptor, mLST18 y PRAS40; su función se relaciona con la transducción de proteínas al inactivar a 4EBP1 y el crecimiento celular por activación de S6K. El complejo mTORC2 no es sensible a la rapamicina, y está formado por mTOR, Rictor, Sin 1 y mLST8; está implicado en la activación de AKT y por tanto de la activación de mTORC1 y todas las señales anteriormente indicadas<sup>66</sup>.



**Figura 12.** Representación esquemática de la vía PI3K-AKT69.

Muchas líneas de investigación implican a la vía mTOR en la hepatocarcinogénesis. Dicha vía está aumentada en más de un 50% de los tumores de HCC, integrando datos de cambios en el número de copias del gen, en la secuencia, niveles de ARNm y datos de inmunohistoquímica, en un gran número de muestras de tejido humano de HCC<sup>70</sup>. Asimismo, en ese porcentaje de HCC, se observa una desregulación de mTOR solo o junto a efectores anteriores o posteriores a mTOR: EGF, IGFBP3, IGF2, raptor, PTEN, RPS6, and p70S6<sup>70</sup>. El supresor de tumores PTEN, que inhibe la vía mTOR, está inactivado en alrededor de un 50% de los tumores de HCC<sup>71</sup>. La activación de AKT en resecciones de HCC se correlaciona con un mayor riesgo de recurrencia del tumor<sup>67</sup>.

Además, la activación de la vía mTOR se asocia con un peor pronóstico en pacientes con HCC. En concreto, un análisis realizado en pacientes con resección hepática, aquellos tumores que presentaban fosforilado RPS6 (pRPS6) (fosforilación producida por mTOR), tenían menores

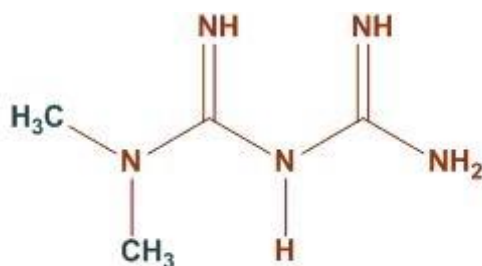


tiempos de recurrencia del tumor en comparación con aquellos pacientes cuyos tumores no tenían pRPS6 (25 meses vs. 50 meses;  $p = 0.004$ ), siendo la expresión de pRPS6 un factor independiente predictivo de recurrencia (HR, 1.8; 95% CI, 1.1–2.8;  $p = 0.01$ )<sup>69</sup>.

### A.3. METFORMINA Y SU USO EN ENFERMEDADES HEPÁTICAS

La metformina es una biguadina oral usada en la práctica clínica para tratar a pacientes con *Diabetes Mellitus* tipo II, así como otras enfermedades asociadas, como el síndrome metabólico. La metformina es un antihiperlipémico, que a dosis elevadas no produce hipoglucemia. Actúa principalmente reduciendo la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepática, pero también reduce la absorción de glucosa del tracto gastrointestinal. Asimismo, en tejidos periféricos, estimula la entrada de glucosa en las células y la oxidación de ácidos grasos<sup>72</sup>.

La metformina se lleva usando desde hace más de 50 años, el órgano diana principal es el hígado, pues tiene mayor cantidad de transportadores de cationes orgánicos 1 (OCT1). Sus efectos positivos se observan sobre el receptor de insulina y su actividad tirosina quinasa<sup>72</sup>.



**Figura 13.** Estructura molecular de la metformina: 1,1-Dimetilbiguanida, fórmula química:  $C_4H_{11}N_5$ .

Su diana principal es el complejo 1 de la cadena respiratoria de la mitocondria, primera enzima transportadora de electrones que utiliza como cofactor NAD/NADH. Al inhibir su actividad, la concentración de ATP/AMP disminuye (porque no se produce ATP pero se sigue consumiendo el ATP celular). El aumento de NAD por bloqueo del complejo 1 de la cadena respiratoria activa a la SIRT1, que activa a su vez a MO25 y STRAD1. Estas dos últimas proteínas activan a su vez a LKB1, encargado de activar a AMPK, que necesita un AMP como cofactor. El dominio quinasa de AMPK es sensible al ratio AMP/ATP, los niveles altos de AMP activan a AMPK, junto con la activación de LKB1<sup>73</sup>.

La proteína AMPK actúa como un sensor intracelular de energía que controla el metabolismo de glucosa y de lípidos. AMPK fosforilada por LKB1, mejora la función del receptor de insulina y el transporte de glucosa, aumentando por tanto la sensibilidad a la

insulina. Además, inhibe los procesos anabólicos, como la síntesis de proteínas y lípidos; y activa procesos catabólicos, como la oxidación de ácidos grasos y la glucólisis<sup>72</sup>.

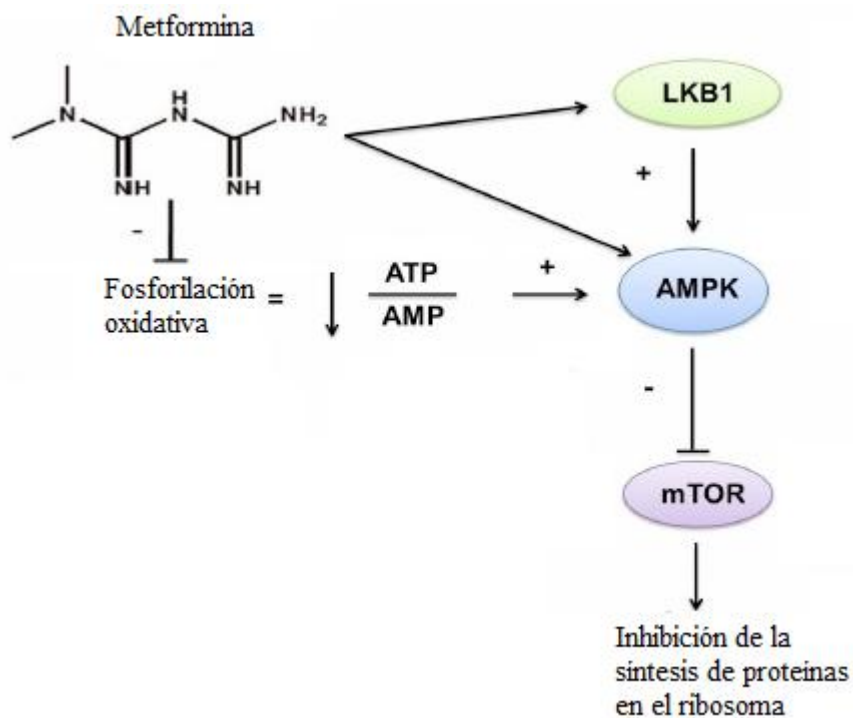


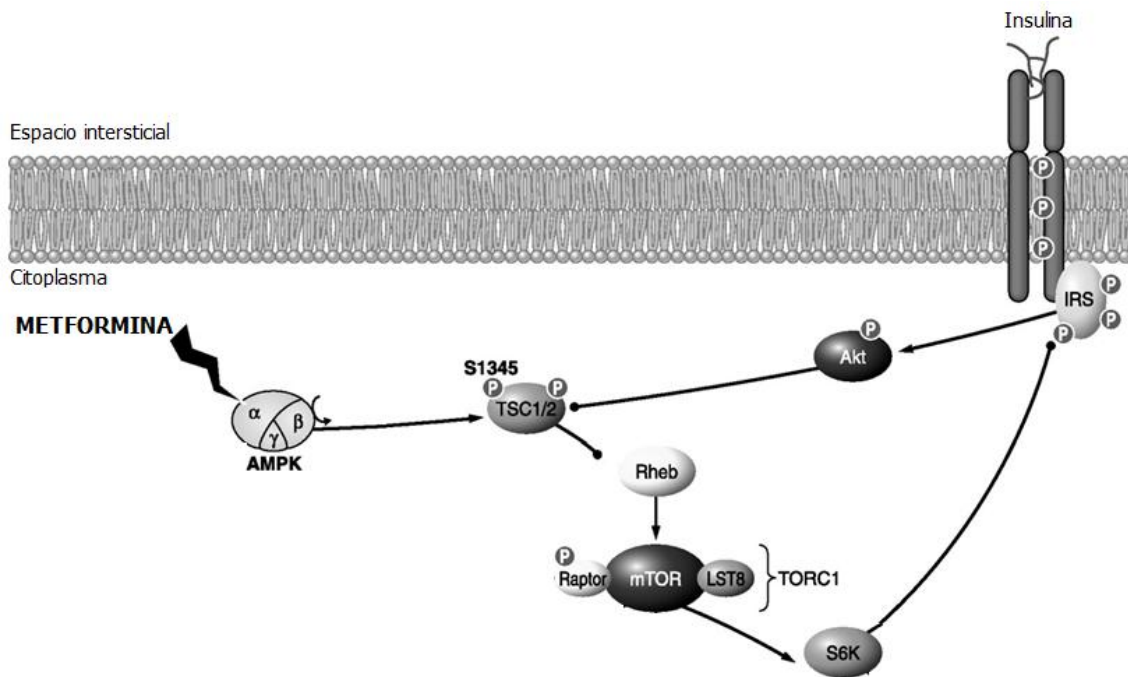
Figura 14. Esquema de la acción de la metformina en la célula<sup>74</sup>.

### A.3.1. METFORMINA Y HEPATITIS C

Como anteriormente hemos comentado, la hepatitis C induce resistencia a la insulina, disminuyendo las posibilidades de respuesta viral sostenida con doble terapia. Como la resistencia a la insulina es tratada con metformina en la práctica clínica, añadiendo metformina al tratamiento estándar podría mejorar la respuesta de los pacientes con hepatitis C. En 2009 Romero-Gómez y colaboradores, diseñaron un estudio donde pacientes infectados con VHC genotipo 1, que presentaban resistencia a la insulina, fueron tratados con doble terapia y metformina, observándose una mejora en la respuesta virológica sostenida de mujeres; aunque en hombres no encontraron diferencias<sup>75</sup>. Posteriormente se ha demostrado en un metanálisis que el tratamiento con metformina aumentaba la proporción de curados en pacientes genotipo 1 tratados con ribavirina y peginterferón (57.4%; 78/136 versus 41.3%; 64/155) (O.R 1.93 (95%CI1.21-3.10), y no se observó ninguna asociación entre la respuesta virológica sostenida y la resistencia a la insulina<sup>76</sup>

La metformina activa a AMPK activando a TSC1/TSC2, que inhibe a Rheb, el cual deja de activar a mTOR que deja de inhibir a IRS1, ya que no la fosforila en Ser 636/639, por lo que se vuelve a activar la vía de señalización de la insulina<sup>71,77</sup>.

Muchos estudios *in vivo* e *in vitro* muestran los beneficios metabólicos de la activación de AMPK en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, la hiperactivación de mTOR está relacionada con muchos cambios desensibilizadores, que afectan al receptor de la insulina y al sustrato del receptor de insulina a los cuales inhibiría<sup>77</sup>.



**Figura 15.** Esquema de la actuación de la metformina sobre el vía de señalización de la insulina. La metformina dejaría de activar a mTOR por lo cual el sustrato del receptor de insulina se volvería a activar en respuesta a la insulina.<sup>78</sup>

### A.3.2. METFORMINA Y CARCINOMA HEPATOCELULAR

En numerosos estudios observacionales, la metformina parece inhibir el riesgo de padecer hepatocarcinoma en pacientes diabéticos. Shing y col. realizaron un meta-análisis evaluando el efecto de las terapias antidiabéticas en el riesgo de padecer HCC, en el que se incluyeron 22.650 casos de HCC, de los cuales 334.307 tenían diabetes mellitus tipo 2. La metformina inhibió en un 50% la incidencia de HCC, mientras el uso de las sulfonilurea e insulina incrementó la incidencia de HCC un 62% y un 161% respectivamente, mientras que las tiazolidinedionas no modificaron el riesgo de padecer HCC<sup>79</sup>. Se ha demostrado que la

metformina tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, inhibidoras del crecimiento celular y antiangiogénicas. Por estos resultados, la metformina podría ser una nueva terapia contra el cáncer, ya que además, se ha asociado a la reducción de varios tumores sólidos como el de próstata, mama, páncreas y colon<sup>80</sup>.

La metformina inhibe la vía mTOR por dos mecanismos: 1) por la activación de AMPK que inhibe a la vía de mTOR; y 2) por la disminución de la glicemia en sangre, lo que inhibe la activación de IGF-R y previene la activación de la cascada mTOR en cánceres respondedores a la insulina. Además, este fármaco inhibe la hepatocarcinogénesis *in vivo* inducida por DEN afectando la litogénesis, e induce la apoptosis en células de HCC *in vitro*, aunque el mecanismo subyacente no es aún conocido<sup>71</sup>.

Además, se ha observado que la actividad de AMPK está disminuida en carcinoma hepatocelular, aunque no en el tejido peritumoral, y un aumento de su actividad por la metformina incrementa p21CIP, p27ZIP, ciclina D1 y p53, parando el ciclo celular en G1 y disminuyendo el número de células que progresan a la fase S<sup>81</sup>.

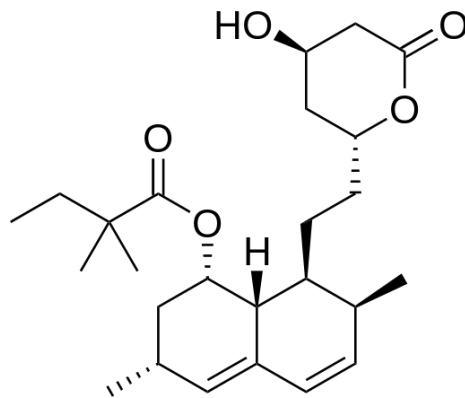
#### A.4. SIMVASTATINA Y SU EMPLEO EN SÍNDROME METABÓLICO Y HEPATITIS VIRALES

Las estatinas son un grupo de medicinas comúnmente usadas en la práctica clínica para disminuir los niveles de colesterol elevados. Su órgano diana principal es el hígado e inhibe el paso limitante de la ruta de síntesis del colesterol, ya que es un inhibidor de la de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoAR). Esta enzima cataliza la conversión de la HMG-CoA a mevalonato, su bloqueo se produce debido al gran parecido estructural que exhiben estos fármacos con el HMG-CoA. Las estatinas además disminuyen los niveles de LDL en sangre por un aumento de la expresión del receptor de LDL en las células<sup>82</sup>.

Se han descrito otros efectos de las estatinas, como propiedades antivirales o como inhibidoras del crecimiento de tumores. Se ha visto una correlación estadística entre el uso de estatinas y la disminución de incidencia de tumores que indican protección frente a varios tipos de cánceres, como de estómago, hígado y linfoma.

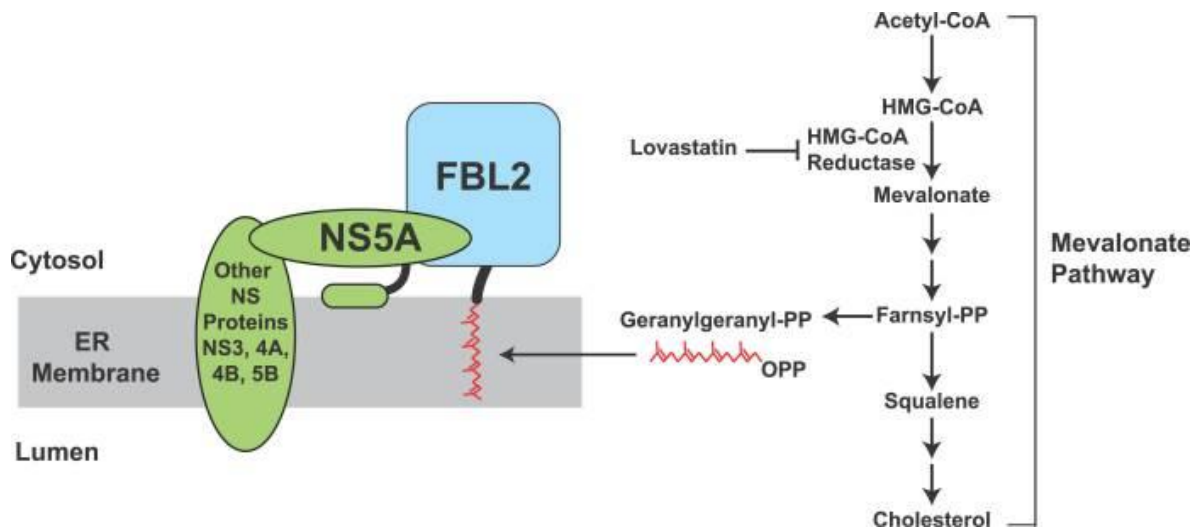
Las estatinas podrían disminuir el riesgo de padecer HCC en pacientes con otras enfermedades hepáticas: en un reciente meta-análisis, se evaluaron 4.298 HCC en 1.459.417 pacientes, hallándose una disminución del 37% por el uso de estatinas. Además, se ha asociado su uso con una disminución de la recurrencia del tumor después de la resección hepática<sup>71</sup>.

La simvastatina es uno de los fármacos de la familia de las estatinas más usados en la práctica clínica. Los efectos anti-cancerígenos se han estudiado en toda la familia de las estatinas, incluida ésta. Los efectos antiproliferativos de la simvastatina pueden tener varios mecanismos distintos de acción, como la inhibición de la proliferación celular por la desregulación de las ciclinas reguladoras del ciclo<sup>83</sup>, el aumento de p19, p21 y p27, la activación de caspasas y Bcl-2 por la vías de MEK-ERK e inhibición de Myc. La simvastatina modifica las moléculas de adhesión celular para reducir el tamaño del tumor y la invasión por la regulación de Rho-dependent kinasa (ROCK)<sup>84</sup>.



**Figura 16.** Estructura molecular de la simvastatina. Fórmula química:  $C_{25}H_{38}O_5$  .

Además la simvastatina tiene propiedades antivirales, en concreto cuando a la terapia estándar se le añadió un tratamiento con simvastatina, en pacientes infectados con VHC, aumentó la respuesta virológica sostenida, pero también disminuyó la progresión de la fibrosis y la incidencia de HCC<sup>85</sup>. Esto es debido a que el virus de la hepatitis C interacciona con el metabolismo de los lípidos para la replicación, el ensamblaje y la maduración del virión<sup>38</sup>. De hecho, el virus de la hepatitis C necesitaría la síntesis de colesterol, así pues el tratamiento con simvastatina bloquearía esta síntesis, y afectaría también a la replicación del VHC. Al bloquearse la síntesis de colesterol, no se generaría el compuesto geranylgeranyl pirofosfato que es utilizado para el anclaje de la proteína FBL2 (F-box and leucine-rich repeat protein 2, FBL2) en el retículo endoplasmático donde interactúa con NS5A y otras proteínas no estructurales en el complejo de replicación<sup>86</sup>.



**Figura 17.** Esquema de la interacción de la Lovastatina en la replicación viral. El uso de estatinas inhibiría a la HMG-CoA Reductasa y disminuiría la síntesis de Geranylgeranyl pirofosfato, disminuyendo el anclaje de FBL2 al retículo endoplásmico y por ende de NS5A del complejo de replicación del virus de la Hepatitis C<sup>86</sup>.

Por todo ello, este trabajo pretende arrojar luz sobre los mecanismos que subyacen en la interacción del virus de la hepatitis C con la vía de señalización de la insulina y la vía AKT/mTOR. Por otro lado, se pretende indagar en los efectos de los tratamientos con metformina y simvastatina sobre la proliferación celular y el papel que puedan desempeñar en la infección por VHC en un modelo *in vitro*, buscando así una explicación a los beneficios que ya se han observado en la práctica clínica.



## **OBJETIVOS**



## B. OBJETIVOS

1. Estudiar las modificaciones de la vía de señalización de la insulina por la infección del virus de la hepatitis C.
  - 1.1 Analizar los cambios de la expresión génica de la vía de señalización de la insulina en células PBMC de pacientes infectados con el virus de la hepatitis C genotipo 1.
  - 1.2 Estudio de las modificaciones a nivel de expresión génica de la vía de señalización de la insulina en un modelo *in vitro* de infección por hepatitis C y los efectos producidos por tratamientos con insulina, metformina e interferón  $\alpha$  2a.
  - 1.3 Cuantificación de las distintas proteínas de la vía de señalización de la insulina modificadas por el virus de hepatitis C en un sistema *in vitro* y por los tratamientos con insulina, metformina e interferón  $\alpha$  2a.
  - 1.4 Estudiar el papel de la metformina sobre la infección del virus de la hepatitis C en un modelo *in vitro*, a diferentes niveles: replicación, cantidad de proteína core, y producción viral.
2. Papel de la metformina y la simvastatina en la infección por el virus de la Hepatitis C y su asociación con el desarrollo de carcinoma hepatocelular
  - 2.1 Estudio de la viabilidad celular y cambios en la expresión génica y proteica de la vía oncogénica de mTOR por el tratamiento con simvastatina y/o metformina en un sistema *in vitro* de carcinoma hepatocelular.
  - 2.2 Estudio de los efectos del tratamiento con simvastatina y/o metformina, sobre la expresión génica y proteica de la vía mTOR en un sistema *in vitro* de carcinoma hepatocelular infectado con el virus de la Hepatitis C.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## C. MATERIALES Y MÉTODOS

### C.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Los pacientes que participaron en el estudio firmaron un consentimiento específico por duplicado, según las normas éticas de la declaración de Helsinki (1975), el cual fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario de Valme. En este consentimiento constaba la autorización para la extracción de sangre, el posterior análisis genético, así como la recogida de datos de pacientes y de los parámetros analíticos.

Se escogieron pacientes curados e infectados del virus de la hepatitis C genotipo 1, siendo respondedores o no al tratamiento con peguinterferon  $\alpha$  y ribavirina, y se seleccionaron ocho pacientes respondedores y ocho no respondedores. Los pacientes (10 hombres y 6 mujeres) tenían una edad media de  $58\pm 10,54$  años, glucosa basal  $87,43\pm 11,48$ , y HOMA  $3,22\pm 2,51$ . Solo un paciente tomaba medicación siendo éste no respondedor (Tab. 1).

**Tabla 4.** Resumen de las características de los pacientes no respondedores (NR) y respondedores (R) a interferón pegilado y ribavirina.

	NR (n=8)	RC (n=8)
Edad	53,37 $\pm$ 3,54	65,42 $\pm$ 3,13
Sexo [V/n]	5/8	5/8
Glucosa Basal	84,37 $\pm$ 2,37	90,28 $\pm$ 5,99
HOMA	3,26 $\pm$ 0,68	3,18 $\pm$ 1,21

Se tomaron muestra de sangre total según el protocolo convencional de aislamiento de células de sangre periférica (PBMC; Peripheral Blood Mononuclear Cells). A cada paciente se le extrajo 3 tubos de hemograma (K2-EDTA) y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos. El sobrenadante que correspondió al plasma sanguíneo fue alicuotado en criotubos, mientras que las PBMC, que quedaron en un halo en la interfase, se transfirieron a un tubo de 50 ml. Estas se resuspendieron en 19 ml de solución de lisis "BD FACS™ Lysing Solution" (Biosciences, USA) que previamente había sido diluido 1:10 en agua libre de pirógenos. Se agitó hasta homogenizar la muestra y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente para la completa lisis de eritrocitos. Con suero fisiológico se completó el tubo de 50 ml y se centrifugó a 285 x g

durante 5 minutos a 20°C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado de células fue resuspendido en 9 ml de PBS-EDTA 5mM (Biowest, USA), centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones. El precipitado se resuspendió en 500 µl de PBS-EDTA 5mM y fue transferido a un tubo de 1,5 ml estéril, se centrifugó a 1500 x g, y el precipitado fue congelado a -80°C.

## **C.2. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR**

Todos los experimentos realizados en líneas celulares se llevaron a cabo en estrictas condiciones de esterilidad, utilizando material de plástico desechable estéril. Las preparaciones que no se habían realizado bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar, fueron esterilizadas mediante filtros estériles de 0,22 µm de poro. En general, las diferentes líneas celulares fueron mantenidas en una estufa de cultivo celular a una temperatura de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con humedad y todas las manipulaciones fueron realizadas en el interior de una cabina de seguridad biológica de flujo laminar vertical (1) o en un laboratorio de seguridad biológica de nivel 3, según el riesgo biológico indicado.

### **C.2.1. LÍNEAS CELULARES HUH7.5 Y HEPG2**

Se utilizaron las líneas células Huh7.5 y HepG2 derivadas de carcinoma hepatocelular humano, habiendo cumplimentado anteriormente el formulario MTA para la línea Huh7.5 (Material Transfer Agreement). Las células fueron cultivadas con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biowest, USA) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SFB) (Biowest, USA), 2mM L-Glutamina (Biowest, USA), 100 U/ml penicilina (Biowest, USA), 100 U/ml estreptomycin (Biowest, USA) y aminoácidos no esenciales 1X (Biowest, USA).

#### **C.2.1.2 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS**

Las células se preservaron congeladas en condiciones óptimas a baja temperatura y en crioviales suplementados con Recovery™ Cell Culture Freezing Medium (Gibco, USA). El proceso de descongelación se realizó en un baño, calentado previamente a 37°C. Se diluyó en medio DMEM suplementado (1:10) para disminuir la concentración de Recovery™ Cell Culture Freezing Medium, y se centrifugó a 200 x g 5 minutos a temperatura ambiente. El precipitado



de células se resuspendió de nuevo en medio DMEM y se sembró en una botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> incubándose a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se lavaron las células con PBS 1X y se sustituyó el medio de cultivo por uno nuevo. Se esperó al menos una semana para su utilización en experimentos, durante la cual se vigiló su viabilidad celular, morfología y confluencia, realizándose pases sucesivos para no superar su límite de confluencia (HepG2 máximo 90% de confluencia, Huh7.5 un 70%).

### ***C.2.1.3 PASES DE LAS LÍNEAS CELULARES***

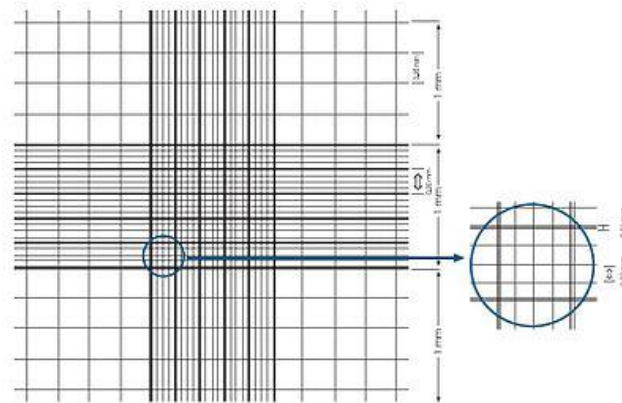
Se retiró el medio de cultivo de las botellas, para lavarlas posteriormente con PBS 1X. Para separar las células de la botella y de las uniones intracelulares se realizó un tratamiento con 1,5 ml de tripsina 1X (Biowest, USA), previamente calentada a 37°C, durante 4 minutos en la estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Al finalizar, se neutralizó la tripsina con un mínimo de 3 ml de medio DMEM suplementado con SBF. Las células se transfieren a un tubo de 15 ml donde se centrifugaron a 300 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio de cultivo DMEM suplementado. Se cuantificaron las células y se utilizó el volumen necesario para sembrar el número de células deseado en una botella o placa, y se completó con medio DMEM suplementado (botellas 75 cm<sup>2</sup>: 12 ml, placas de 6 pocillos: 3ml, placas de 96 pocillos 200µl de medio de cultivo).

### ***C.2.1.4. CONTEO CELULAR***

El conteo celular se realizó por cámara de Neubauer. De las muestras de células previamente preparadas y homogenizadas se pipetearon 10 µl en cada cuadrícula de la cámara, procediéndose al conteo de las células. Se cuenta el número de células de los cuadrantes externos y del cuadrante central, y calculamos el número de células promedio.

Para el cálculo de células totales se aplicará la siguiente fórmula:

- Células por ml = (Promedio de las células contadas) x 10.000. Donde 10.000 es el factor de conversión de la cámara.
- Número total de células = (Células por ml) x (Volumen total de la muestra en ml).



**Figura 18.** Detalle de la rejilla de la cámara de Neubauer

### C.2.2 CULTIVO DE HEPATOCITOS PRIMARIOS

Los hepatocitos primarios fueron aislados de biopsias de hígado procedente de 5 pacientes que se sometieron a una resección de tumor, después de obtener el consentimiento informado del paciente. Para empezar se realiza un lavado del tejido y posteriormente una perfusión con tampón HEPES durante 30 segundos por cada vena o arteria del tejido, posteriormente se perfunde con EGTA y se vuelve a perfundir con tampón HEPES para lavar el tampón anterior, todo ellos se realiza 37°C. Por último, se perfunde el tejido una solución de colagenasa durante máximo 20 min. El homogenado es suplementado con BSA-HEPES, y se filtra con un filtro de malla de nylon (250), y se lava el filtro dos veces con BSA-HEPES para recoger los hepatocitos que se hubiera quedado atrapados en el tejido no dissociado. Se centrifuga el homogenado a 5 min 50g, se descarta el sobrenadante mientras que el sedimento (hepatocitos) se resuspende en BSA-HEPES y se homogeniza con la pipeta suavemente, se repite estos dos últimos pasos dos veces más. La viabilidad celular fue de un 85% cuantificado por trypan blue como criterio de exclusión. Los hepatocitos primarios ( $8 \times 10^6$  células) se sembraron 150.000 células/cm<sup>2</sup> en placas recubiertas con colágeno tipo I y se mantuvieron en medio DMEM-Ham-F12:William's E (1:1) suplementado con 26 mM de NaHCO, 15 mM de HEPES, 0,29 g/litro de glutamina, 50 mg/litro de vitamina C, 0,04 mg/litro dexametasona, 2 mg/litro de insulina, 200 g/litro de glucagón, 50 mg/litro de transferrina, y 4 ng/litros etanolamina que contiene 5 % de suero de ternera fetal, durante 12 horas<sup>87</sup>. Después, se retiró el medio y se reemplazó con un medio de cultivo fresco, que se reemplazaba cada 24 horas.

### C.3. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES INFECCIOSAS

El ARN viral del replicón JFH1 fue cedido previa autorización y firma de un MTA por el equipo de Bartenschlager (Universidad de Heidelberg, Alemania). El ARN se introdujo en las células Huh7.5 por electroporación con 5 µg de ARN viral, usando el sistema Amaza nucleofactor II de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células electroporadas fueron cultivadas en botellas de 75cm<sup>2</sup> durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, con medio DMEM en el laboratorio de seguridad biológica nivel 3. Trascurrido dicho tiempo, se recogió el sobrenadante y con un filtro de 0,45µm diámetro de poro se eliminaron los restos de células muertas. Se realizó la titulación de las partículas virales por inmunohistoquímica (TCDI50/ml). Después de la titulación, el medio de cultivo con las partículas infectivas se añadió a las células nuevas (1 partícula viral por célula) durante 72 horas.

Se recomienda el uso de Huh7.5 para la producción de partículas virales por ser más susceptibles a la infección y liberación de más partículas.

#### C.3.1. TRANSFECCION POR ELECTROPORACIÓN

En nuestro estudio se utilizó la electroporación para obtener partículas virales. Se electroporó el ARN viral y se dejó 48 horas en el interior de las células, tiempo suficiente para que el virus replique y salga al sobrenadante, y obtener así partículas virales.

Las etapas de la producción de partículas virales infecciosas:

- 1. Tripsinización celular:** Las células Huh7.5 fueron lavadas con PBS y tratadas con tripsina durante 4-5 minutos, tras lo que se añadió medio DMEM complementado con SBF para anular la acción de la tripsina.
- 2. Cuantificación celular y electroporación:** se contabilizaron 4.500.000 células por la cámara de Neubauer, y se centrifugaron (200 x g 5 min a temperatura ambiente). Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con Opti-MEM® (12ml), se volvieron a centrifugar las células para volver a desechar el sobrenadante. Se añadió 100 µl de Nucleofactor™ *Kit for Cell Lines* y 5 µg de ARN viral, y se resuspendieron las células. Se

tomó todo el volumen y se colocó en la cubeta de electroporación donde se electroporaron a 260 voltios (V) y 950 microfaradios ( $\mu\text{F}$ ) con el sistema Amaxxa Nucleofactor. Tras la electroporación se recogieron las células y se sembraron con 12 ml de medio suplementado en frascos de cultivo de  $75\text{cm}^2$ , donde se incubaron 48 horas a  $37^\circ\text{C}$ , y 5% de  $\text{CO}_2$  en el laboratorio P3.

- 3. Recolección del virus producido:** Tras 48 horas de incubación, se recogió el medio de cultivo del frasco y con un filtro de  $0,45\mu\text{m}$  diámetro de poro se eliminaron los restos de células muertas. El medio de cultivo se guardó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su cuantificación.

#### C.4. TITULACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES

La técnica de elección fue la inmunohistoquímica. Se sembraron 10.000 células Huh7.5 en cada pocillo de una placa de 96. Se añadió una dilución seriada 1:10 del medio de cultivo recogido de las células electroporadas con el ARN viral a las 3 horas del sembrado celular. Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , y 5% de  $\text{CO}_2$  en un laboratorio de contención biológica riesgo 3, tras 48 horas se procedió a realizar la técnica de inmunohistoquímica contra la proteína core del VHC.

- 1. Fijación:** Para la fijación se hicieron lavados sucesivos con PBS 1X para eliminar los restos del medio de cultivo y se fijó la muestra con metanol a  $-20^\circ\text{C}$  durante 20 min. Tras los que se realizaron más lavados de 5 min con PBS para eliminar completamente el metanol.
- 2. Permeabilización y bloqueo.** La permeabilización para asegurar la fácil penetración de los anticuerpos, se realizó por un tratamiento con una solución con detergente al 0.1-1% de saponina. El protocolo usado en este estudio realizó el boqueo y la permeabilización en un solo tratamiento conjunto de 1 hora a temperatura ambiente, usando la siguiente solución:
  - 0,5% de saponina (Sigma Aldrich, Alemania)
  - 1% BSA (Bovine Suero Albuminun) (PAA, Austria)
  - 0,2% de leche en polvo (Bio-Rad, USA)
  - 0,02% de Sodio acida (Sigma Aldrich, Alemania).

La solución fue eliminada y se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% en PBS durante 5 min para eliminar la señal de peroxidasa endógena, tras lo que se realizaron sucesivos lavados con PBS.

- 3. Incubación con el anticuerpo primario:** Tras la puesta a punto del anticuerpo, se realizó una dilución 1:300 en PBS 1X del Anticuerpo anti-core (Hepatitis C core proteins, mAB (C7-50) R2W ALZ-804-277-C100 Axxora Enzo, Life Science, USA). Se añadieron 30 µl en cada muestra durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS.
- 4. Incubación con el anticuerpo secundario:** Se diluyó 1:200 el anticuerpo secundario específico  $\alpha$ -mouse-HRP (Abnova, Taiwan) en PBS y fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS.
- 5. Detección de la actividad HRP (*Horseradish peroxidase*):** Para detectar la actividad peroxidasa del anticuerpo secundario, se utilizó el kit VECTOR® Nova Red Substrate Kit (for peroxidase) SK-4800 (Vector, USA). Según las instrucciones del fabricante, se preparó una solución con 5ml de agua destilada, 3 gotas del reactivo 1, 2 gotas del reactivo 2, 2 gotas del reactivo 3, 2 gotas del reactivo hidrógeno peroxidasa. La solución resultante se añadió a cada muestra y se incubó entre 5-15 min a temperatura ambiente, la reacción se interrumpió realizándose un lavado de 5min con agua destilada. La placa fue conservada en PBS y a 4°C hasta realizar la lectura.
- 6. Cálculo de la dosis efectiva 50% de virus tras crecimiento en cultivo celular (TCID<sub>50</sub>/ml) (Método de Reed y Muench)<sup>88</sup>:** Las células infectadas o positivas son las que poseen un precipitado pardo, mientras las negativas carecen de color.  
  
El punto final en la cuantificación del virus es la dilución en la cual el 50% de las células de cultivo están infectadas (TCID<sub>50</sub>/ml). Se utilizó una hoja de cálculo Excel para realizar este índice.

## **C.5. INFECCIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HUH7.5 CON EL REPLICÓN JFH1.**

Las líneas celulares Huh7.5 fueron infectadas con las partículas virales previamente cuantificadas. Para ello, se sembraron 50.000 células en los pocillos de las placas M6 u 800.000 células en los frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup>. Una vez que las células estuvieron adheridas a la base del pocillo (tras 3 horas de ser sembradas), fueron infectadas con el replicón JFH1 (1 partícula viral/célula) durante 72 horas. Trascurrido este tiempo las células se recogieron y se procedió a la extracción de ARN total y proteínas.

## **C.6. TRATAMIENTO CON METFORMINA, SIMVASTATINA, INTERFERON E INSULINA.**

Para el estudio de las alteraciones en la vía de señalización de la insulina por VHC, se cultivaron células de la línea celular Huh7.5 y se trataron con insulina (Lilly, USA), metformina (Acofarma, España) o interferón  $\alpha$ -2a (Sigma Aldrich, USA). Sin embargo, para el análisis de las modificaciones de la vía PI3K/AKT/mTOR por simvastatina (Sigma, Estados Unidos) y metformina, y su efecto en el desarrollo de hepatocarcinoma, se cultivaron las líneas celulares HepG2, Huh7.5 y hepatocitos primarios de hígado tratadas con metformina y/o simvastatina. Los tratamientos se añadieron 3 horas después del sembrado de las células en las líneas celulares y a las 24 horas del sembrado de los hepatocitos primarios. En los experimentos en los que las células se infectaban con JFH1, los diferentes tratamientos y la infección se añadieron simultáneamente.

La concentración final de metformina en el medio de cultivo fue de 2mM, diluida en agua bidestilada. La simvastatina se diluyó en Dimetil sulfóxido (DMSO) (Panreac, Alemania) debido a sus propiedades de solubilidad. La concentración final en el medio de cultivo fue de 2 $\mu$ M. La insulina se utilizó a una concentración de 100nM mientras que el interferón- $\alpha$ -2a se utilizó a una concentración final de 50UI/ml.

## C.7. ENSAYOS PARA DETERMINAR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LA METFORMINA Y LA SIMVASTATINA

Para el estudio de la toxicidad de los fármacos simvastatina y metformina en cultivos celulares, se utilizaron concentraciones crecientes de metformina (0,5, 2 y 10mM) y simvastatina (1, 2 y 4 $\mu$ M) en las dos líneas celulares, HepG2 y Huh7.5.

Se sembraron 50.000 células de Huh7.5 o HepG2 en placas M6 y se añadieron los diferentes tratamientos a las distintas concentraciones. A los controles para la viabilidad celular de la simvastatina, se les añadió el volumen de DMSO (vehículo de la simvastatina) correspondiente a la máxima dosis de simvastatina (12 $\mu$ l). La viabilidad celular fue analizada a diferentes tiempos 24, 48 y 72 horas.

### C.7.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CON AZUL TRYPAN

La utilización de una cámara de Neubauer y la tinción con azul trypan (Applchem, Alemania) permitió hacer medidas de proliferación y viabilidad celular con los distintos tratamientos: simvastatina y metformina cuantificándose el número de células viables y no viables.

Las células fueron levantadas con tripsina 1X y neutralizadas con medio de cultivo. Se realizó una dilución 1:1 de azul trypan con una alícuota de las células, se montó la dilución en la cámara de Neubauer y se contaron por el microscopio óptico el número de células teñidas (células no viables) y sin teñir (viables).

El número de células por ml se obtuvo multiplicando la media de células contadas por el factor de dilución del cultivo y del azul trypan (Applchem, Alemania), y por 10.000 (factor de conversión de la cámara). Este resultado corresponde con el número de células viables/ml o no viables/ml. Para determinar la viabilidad y la mortalidad celular, se tiene en cuenta el recuento total de células.

- $X\%$  Viabilidad celular =  $(n^{\circ} \text{ células viables} / n^{\circ} \text{ células totales}) * 100$ .
- $X\%$  Mortalidad celular =  $[(n^{\circ} \text{ total de células} - n^{\circ} \text{ células viables}) / n^{\circ} \text{ células totales}] * 100$ .

## C.8. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL CON TRISURE™ (BIOLINE)

Para analizar la expresión de los diferentes genes implicados en la vía de señalización de la insulina, en la vía PI3K/AKT/mTOR y la replicación de JFH1, se realizó la extracción del ARN de las células cultivadas y de las PBMC.

Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS 1X, se añadió 500 µl de TRIsure (tiocianato de guanidina)(Bioline, UK) en una cabina de extracción de gases. Recogidas las células con el TRIsure se trasvasó a un tubo de 1,5 ml donde se añadió 100 µl de cloroformo (Applichem, Alemania), se agitó vigorosamente y se dejó reposar 2-3min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. La solución se separó en dos fases: una acuosa con ARN, y otra orgánica con las proteínas y el ADN. Se recogió la fase acuosa y se añadieron 250µl de isopropanol (Sigma-Aldrich, Alemania) y se dejó incubar 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 x g 10 min a 4°C y el precipitado se lavó con 500µl de etanol 75% en H<sub>2</sub>O-DEPC, para volverse a centrifugar a 7.500 x g durante 5 min 4°C. Se retiró el etanol y se dejó secar el precipitado, que posteriormente se resuspendió en H<sub>2</sub>O-DEPC y se incubó 10 min a 55°C para solubilizar el ARN. La cantidad de ARN de las muestras se cuantificó por el fluorómetro Qubit, con el kit Qubit RNA HS assay kit (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN es un material extremadamente lábil, y deben tomarse las máximas precauciones para evitar la contaminación con ribonucleasas (RNAasas) para prevenir su degradación. Las RNAasas son enzimas muy estables y activas, y no requieren ningún cofactor para su funcionamiento. Además, son muy difíciles de inactivar, soportan el autoclavado y son insensibles a los métodos estándar para la inactivación de proteínas. Es importante trabajar en un ambiente libre de ARNasas y debe tratarse el material para su eliminación.

## C.9. TRASCRIPTIÓN INVERSA

Debido a la sensibilidad del ARN se procedió a realizar una transcripción inversa o retrotranscripción para poder trabajar con el ADNc, producto mucho más estable. Se utilizó el kit de Qiagen®: QuantiTect Reverse Transcription Kit (Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.



Se utilizó 0,5 µg de ARN para obtener 20 µl de ADNc, por lo que se empleó el volumen necesario de cada muestra de ARN, según su concentración, para tomar 0,5 µg, completándose con H<sub>2</sub>O-DEPC (Bioline, UK). Se inició la reacción eliminando el posible ADN genómico que hubiera en la muestra y para ello se realizó un tratamiento con 2 µl de gDNAsa, incubándose 2 min a 42°C. Después se añadió a cada muestra 6 µl de una solución que contenía: 1 µl de transcriptasa inversa, 1 µl de RT-primers y 4 µl de RT-Buffer, incubándose 20 min a 42°C para que la transcriptasa inversa llevara a cabo la retrotranscripción, y 3 min a 95°C para inactivar la enzima. Las muestras se almacenaron en hielo hasta su cuantificación por el Qubit, con Qubit dsDNA BR assay kit (Invitrogen, USA) según las instrucciones del fabricante.

## C.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: PCR

Para cuantificar la expresión génica se utilizó la técnica de PCR a tiempo real (qPCR). Primero, se realizó la optimización del gen de referencia, para ello se hicieron repeticiones sucesivas de varios genes candidatos de los aislados de células de cultivo Huh7.5 y HepG2. Así pues, fue determinado como gen de referencia el gen GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Se analizaron los niveles de expresión de los genes IRS1, PI3K, MAP3K, AKT, MTOR, PTEN1, PTEN4, TCTP1 y PTP1B, implicados tanto en la vía de señalización de la insulina como en carcinogénesis. También se cuantificó mediante PCR la cantidad de ARN viral, por cebadores diseñados y puestos a punto en nuestro laboratorio. La puesta a punto de los cebadores consistió en realizar diferentes PCR con concentraciones seriadas de ADN, a diferentes temperaturas y tiempos de amplificación, de tal manera que se escogieron aquellas condiciones donde la amplificación fue la más lineal.

La PCR se hizo en el termociclador (Illumina®California, Roche) utilizándose el Kit SYBR® Low-ROX Quantance (Bioline, UK), con 1 ng de ADNc, 5 µl de buffer y 1 µl de cebador. El programa de PCR consistió en una primera etapa a 95°C de 15min, un segunda etapa con 40 repeticiones de ciclos de 95°C 15 segundos, 60°C 15 segundos, 72°C 30 segundos, y una última etapa con la curva de disociación de dos ciclos: de 95°C 15 segundos, y un incremento progresivo de la temperatura desde los 50°C a los 95°C. Este programa se utilizó con todos los cebadores comprados de la casa comercial Qiagen, excepto con el cebador de JFH1,

realizándose un cambio, en el segundo ciclo de la segunda etapa (40 repeticiones) programándose a 63°C 20 segundos en lugar de 60°C 15 segundos.

**Tabla 5.** Relación de los oligonucleótidos utilizados en el estudio

Gen	Cat	Casa Comercial
IRS1	QT00074144	QIAGEN
PI3K	QT00023100	QIAGEN
AKT	QT00085379	QIAGEN
MTOR	QT00056133	QIAGEN
MAP3K	QT00088998	QIAGEN
PTEN1	QT00086933	QIAGEN
PTEN4	QT01676969	QIAGEN
TCTP	QT00063252	QIAGEN
PTP1B	QT01006978	QIAGEN
MAP1LC3B	QT00055069	QIAGEN
DCTN4	QT00038766	QIAGEN
GAPDH	QT00199633	QIAGEN
JFH1	Fwd: CTGTGAGGAACTACTGTCT Rev: CGCCCTATCAGGCAGTACCA	NO COMERCIAL

Una vez obtenidos los valores del ciclo umbral (Ct) de cada muestra, con el programa *Eco Real-Time PCR System v3.0*, se cuantificó la variación relativa en la expresión génica mediante el método de comparación de Ct, usando la fórmula aritmética desarrollada por Pedersen, 2001:

- Variación de los niveles de expresión =  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ .
- $\Delta Ct = Ct \text{ problema} - Ct \text{ gen de referencia}$ .
- $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ situación experimental} - \Delta Ct \text{ situación control}$ .

## C.11. CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL DEL MEDIO DE CULTIVO

Para la cuantificación de la carga viral del medio de cultivo, se cuantificó la cadena positiva de ARN del VHC, mediante el sistema automatizado COBAS Ampliprep/COBAS Taqman HCV Test (Roche Diagnostics, Alemania), en el Departamento de Microbiología del Hospital

Universitario Virgen de Valme. Este sistema tiene tres pasos: 1) Preparar la muestra para aislar el ARN-VHC, 2) Transcripción reversa del ARN viral para generar el ADNc, 3) Amplificación por qPCR del ADNc-VHC. Los límites de sensibilidad 10 UI/ml de ARN/VHC.

La preparación de la muestra es automatizada (COBAS Ampliprep) mediante una técnica de captura genérica basada en sílice. Se procesaron 850 µl de medio de cultivo, que se distribuyeron en sus tubos correspondientes, junto con cuatro casetes que contenían todos los componentes necesarios para la cuantificación del VHC: partículas magnéticas de vidrio, reactivo de lisis, proteasas y reactivos para la cuantificación específica de VHC: cebadores de la región 5'UTR, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), las sondas oligonucleótidas fluorescentes específicas del VHC, la ADN polimerasa Z05, la enzima uracil-N-glicosilasa AmpErase y manganeso. La lisis de las partículas se llevó a cabo mediante incubación a temperaturas elevadas con la proteasa, y el tampón de unión/lisis liberó los ácidos nucleicos protegiendo el ARN liberado de las ARNasa del medio. Posteriormente, se incubó la mezcla, y el ARN se unió a las partículas magnéticas de vidrio (las sustancias no unidas se eliminaron tras los lavados de las partículas). Los ácidos nucleicos se eluyeron a temperatura elevada en una solución acuosa y fueron transferidas al analizador COBAS Taqman.

Las muestras procesadas se transfirieron al tubo donde tiene lugar la retrotranscripción y la amplificación por qPCR. Las muestras se calentaron para permitir que el cebador inverso hibridara con el ARN-VHC y empezara la polimerasa Z05 a retrotranscribir la cadena de ARN viral. Posteriormente, se desnaturalizó el híbrido ARN:ADNc por calor, y permitió la accesibilidad del cebador directo que se unía mientras la mezcla se enfriaba. La enzima Z05 ejerció su función de ADN polimerasa y sintetiza el amplicón, este paso se repitió un número de ciclos predeterminado. La acumulación de productos de PCR se monitorizó por la intensidad de la emisión de las moléculas fluorescentes (sondas oligonucleótidas liberadas en el proceso de amplificación). La amplificación selectiva del ARN viral se logró por la enzima AmpErase, que catalizó las cadenas de ADN que contenían desoxiuridina, pero no las que contenían desoxitimidina, de tal manera que dicha enzima destruye el amplicón contaminante así como cualquier producto inespecífico que se hubiera formado. Una vez finalizado el proceso, a cada muestra positiva se le asignó un valor de carga viral en unidades internacionales por mililitro (UI/ml).

## C.12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para recoger las proteínas totales de las células, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron con PBS 1X. Se añadió el volumen indicado del buffer de extracción de proteínas totales M-PER<sup>®</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo SCIENTIFIC, USA), según el protocolo del fabricante. Las células fueron levantadas con ayuda de un rascador y se les añadió un inhibidor de proteasas (1  $\mu$ l por cada 100  $\mu$ l de muestra). Se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a 12.000 x g. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 ml. La cuantificación proteica se realizó en el Qubit, con el kit Qubit Protein assay (Invitrogen, USA).

## C.13. INMUNODETECCION DE PROTEÍNAS: WESTERN-BLOT (INMUNOBLOT)

Las alícuotas con 50  $\mu$ g de proteínas se desnaturalizaron con Laemmli (Bio-Rad, USA) y  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma Aldrich, Alemania) calentándolas a 95°C 5 min. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10 o 12% (Mini-proteian TGX Stain free Gels, Bio-Rad, USA) en función del peso molecular de la proteína de interés, en tampón de Tris-Glicina (Bio-Rad, USA). La electroforesis se realizó a 25 mA y 300 V durante 45 minutos con el sistema *mini-protean* de Bio-Rad.

Finalizada la electroforesis, se procedió a realizar la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa. Según el peso molecular de la proteína a detectar se eligió la técnica de transferencia adecuada. Para las proteínas de bajo peso molecular (menor de 30 KDa) se realizó una transferencia húmeda con el sistema *mini-transblot* de Bio-Rad, en tampón Tris-Glicina-Metanol (Bio-Rad, USA). Para las proteínas de alto peso molecular (por encima de 30 KDa) se realizó una transferencia seca por el sistema iBlot<sup>®</sup> Dry Blotting System de Life technologies. Se verificó la eficiencia de la transferencia y la igualdad de proteínas en cada pocillo por la tinción reversible con rojo Ponceau (Applichem, Alemania) de la membrana.

Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo o BSA al 5% en TTBS (Tris-Buffer Salino y Tween 20, Bio-Rad, USA) durante una hora a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó por incubación durante toda la noche a 4°C, con los anticuerpos primarios comerciales anti- $\beta$ actina (como control), anti-core, anti-IRS1, anti-PI3K, anti-AKT, anti-mTOR, anti-MEKK1, anti-PTEN, anti-TCTP, anti-PTP1B, anti-p53 y anti-CASPASA 3, seguido

por otra incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes. La detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del fabricante (*WesternBright™ ECL*, Advansta, USA). Se utilizó el *ChemiDoc™ MP Imaging System* para la captación de la imagen quimioluminiscente de la membrana de nitrocelulosa marcada con el anticuerpo primario y secundario, además con el software se procesó digitalmente la imagen y se cuantificó las bandas correspondientes a las proteínas deseadas.

**Tabla 6.** Relación de los anticuerpos utilizados en el estudio

Proteínas	Cat	Casa Comercial
IRS1		Cell Signaling
PI3K	3811	Cell Signaling
AKT	9272	Cell Signaling
MTOR	2972	Cell Signaling
PTEN	9552	Cell Signaling
TCTP	Sc-133131	Santa Cruz Biotechnology
PTP1B	5311	Cell Signaling
LC3B	2775	Cell Signaling
CASPASA 3	9665	Cell Signaling
Core	ALX-804-277	Enzo Life Science
B-Actina	4967	Cell signaling

## C.14. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 17.0. Los resultados fueron expresados con la media y la desviación estándar de tres experimentos realizados de forma independiente. Para saber si las variables presentaban una distribución normal, se empleó el test de Shapiro Wilk ( $n \leq 50$ ).

Para saber si había diferencias entre las variables paramétricas se realizó una t-Student o un Anova, dependiendo de si queríamos comparar las muestras dos a dos o bien globalmente. En el Anova, para saber que test de corrección se debía usar, se realizó un test de Levene de homogeneidad de varianzas. Para las variables con varianzas homogéneas se utilizó

el test de Bonferroni, como test de corrección, mientras que para las varianzas no homogéneas se utilizó el test T2 de Tamhane.

El nivel de significación ( $p$ ) se realizó con un intervalo de confianza del 95%, tanto para las comparaciones globales como en las comparaciones dos a dos. Los niveles de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) fueron considerados estadísticamente significativos.

# **RESULTADOS**



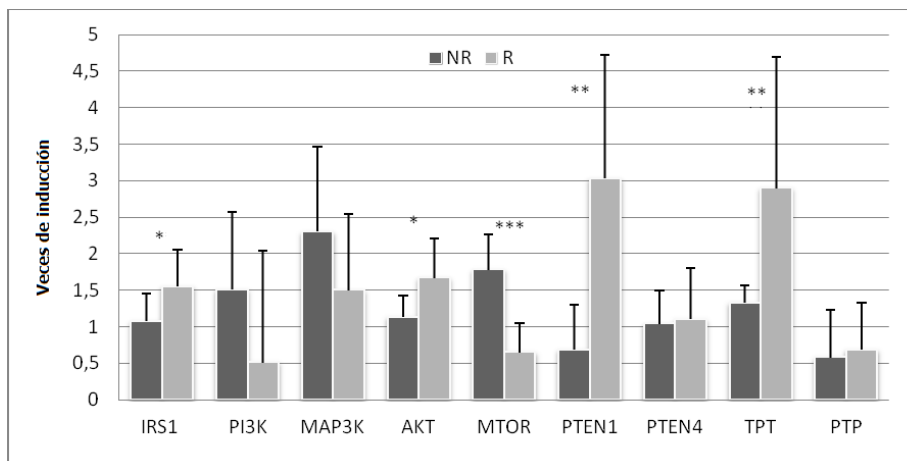


## D. RESULTADOS

### D.1 ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

#### D.1.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE DE PACIENTES

Para investigar el efecto de la infección viral sobre la vía de señalización de la insulina *in vivo*, se analizaron los niveles de expresión de los genes de dicha vía en PBMC de pacientes infectados con VHC genotipo 1, después de haber sido tratados con doble terapia: interferón y ribavirina. Se dividieron las muestras según la respuesta al tratamiento del paciente: respondedor o no respondedor a la doble terapia.



**Figura 19.** Niveles de expresión génica de la vía de señalización de la insulina en PBMC de pacientes no respondedores (NR) respecto a los respondedores (R) a la doble terapia contra la hepatitis C crónica.

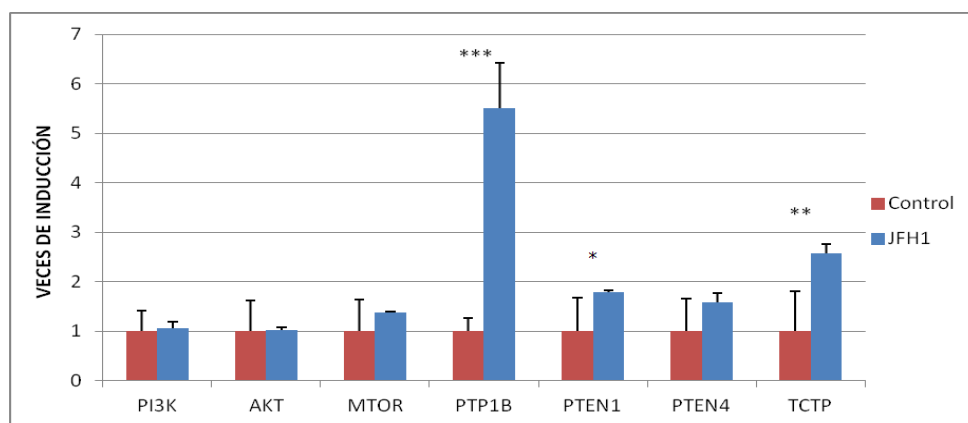
Se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes IRS1, AKT, MTOR, PTEN1 y TCTP entre los pacientes respondedores y los no respondedores a la doble terapia.

La expresión génica de mTOR estaba aumentada en pacientes no respondedores ( $1,78 \pm 0,48$  veces) e inhibida en pacientes respondedores ( $-1,54 \pm 0,40$ ). Asimismo, en dichos pacientes la expresión génica de IRS1, AKT, PTEN1 y TCPT se encontraba aumentada ( $1,55 \pm 0,37$ ,  $1,67 \pm 0,54$ ,  $3,03 \pm 1,70$  y  $2,90 \pm 1,80$  veces respectivamente) (Fig. 19).

## D.1.2. MODIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS HUH7.5 INFECTADAS CON EL REPLICÓN JFH1.

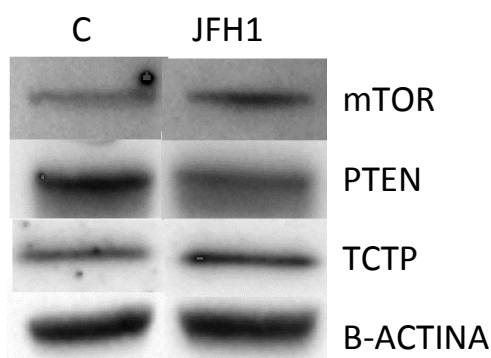
Para conocer cómo el virus de la hepatitis C variaba la vía de señalización de la insulina *in vitro*, se analizó la expresión génica y proteica de esta vía, en células Huh7.5 infectadas con el replicón vírico JFH1.

La expresión de los genes de la vía no se modificó con la infección por JFH1, pero sí aumentó la expresión de los inhibidores, teniendo diferencias significativas en PTP1B, PTEN1 y TCTP (PTP1B:  $5,51 \pm 0,91$ , PTEN1:  $1,79 \pm 0,01$ , TCTP:  $2,57 \pm 0,18$  veces de inducción), y observándose una tendencia al aumento de la expresión génica de PTEN 4 ( $1,59 \pm 0,18$  veces de inducción) (Fig. 20).



**Figura 30.** Cambios de expresión génica de la vía de señalización de la insulina producidos por la infección con el replicón JFH1.

La expresión proteica varió por la infección, la cantidad de PTEN disminuyó (PTEN:  $1,61 \pm 0,17$  veces) mientras que mTOR y TCTP aumentaron sus expresiones ( $1,61 \pm 0,13$  y  $2,19 \pm 0,9$  veces respectivamente) (Fig. 21).

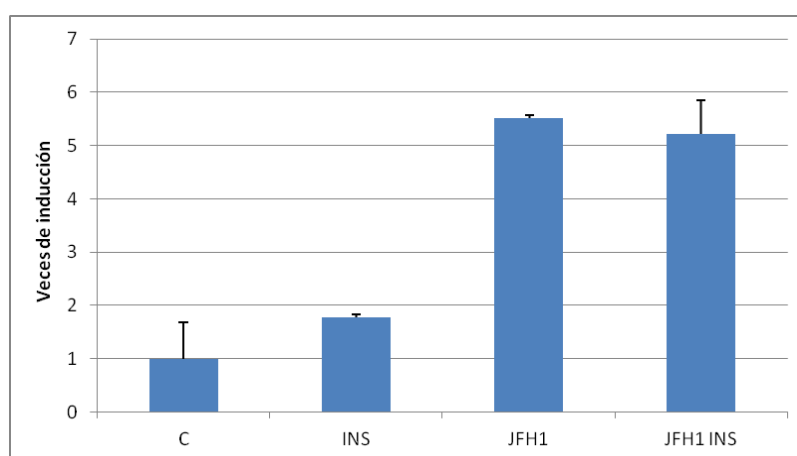


**Figura 21.** Modificaciones de la expresión proteica de la vía de señalización de la insulina producidas por la infección con JFH1

### D.1.3. MODIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS INFECTADAS POR INSULINA.

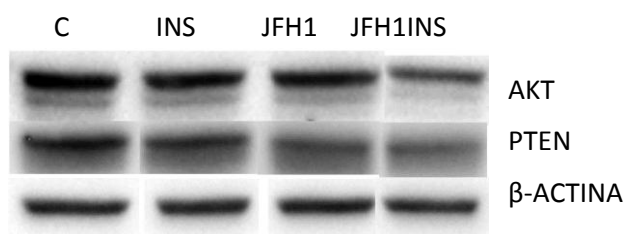
Se estudió cómo se modificaba la vía de señalización de la insulina al tratar las células infectadas del replicón JFH1, con la citada hormona.

En células sin infección el tratamiento con insulina modificó la expresión génica de PTP1B, que aumentó  $1,77 \pm 0,13$  veces su expresión. En células con infección, aumentó la expresión de PTP1B:  $5,51 \pm 1,07$  veces, y el tratamiento con insulina en dichas células, no varió la expresión de PTP1B con respecto al virus ( $5,21 \pm 0,91$  veces) (Fig. 22).



**Figura 22.** Modificación de la expresión génica de PTP1B por el tratamiento con insulina (INS).

La insulina inhibió la expresión proteica de AKT ( $-1,47 \pm 0,25$  veces) cuando las células estaban infectadas con JFH1; al igual que PTEN, que tras el tratamiento con insulina disminuyó aun más su expresión en comparación con la observada en células infectadas ( $1,9 \pm 0,5$  veces) (Fig. 23).

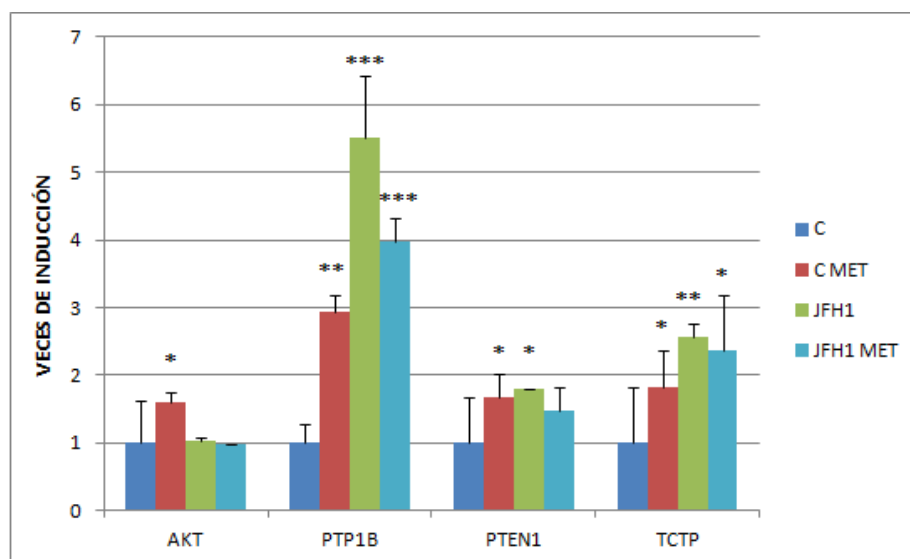


**Figura 23.** Expresión proteica de la vía de señalización de la insulina en células Huh7.5 tratadas con insulina (INS) e infectadas con JFH1.

#### D.1.4. MODIFICACIÓN POR EL TRATAMIENTO CON METFORMINA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS INFECTADAS.

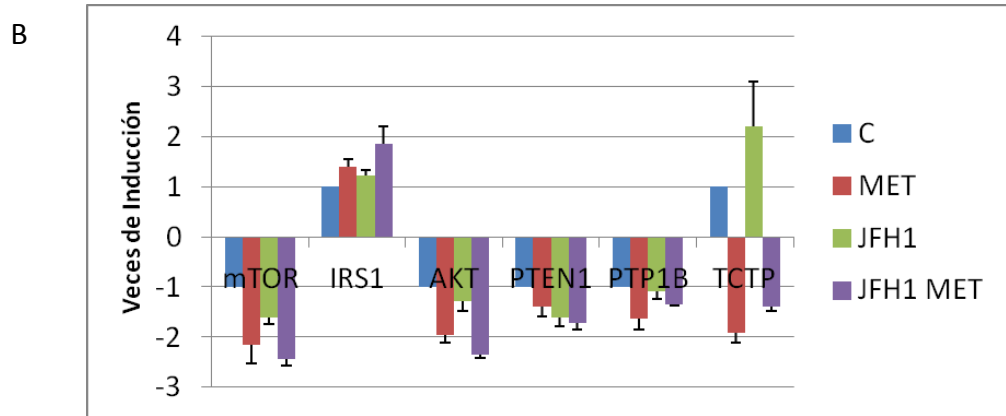
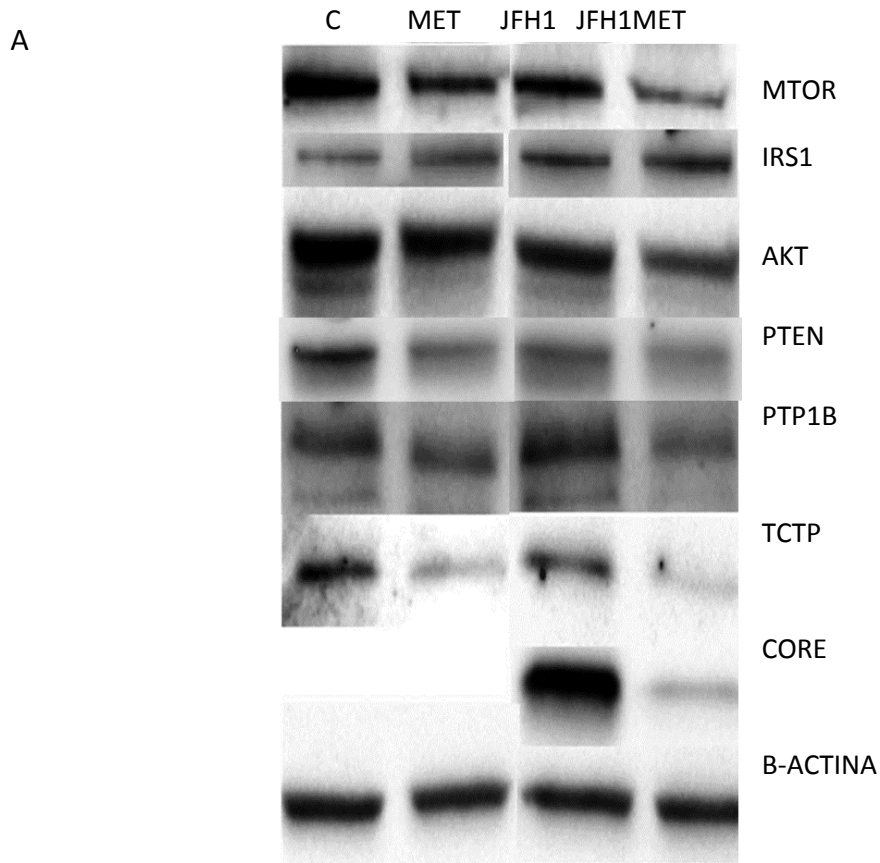
Las células infectadas con JFH1 se trataron con metformina, tratamiento de elección en situación de resistencia a la insulina.

En células tratadas con metformina, la expresión de AKT, PTP1B, PTEN1 y TCTP se encontraba aumentada (AKT:  $1,60 \pm 0,14$ , PTP1B:  $2,93 \pm 0,25$ , PTEN1:  $1,83 \pm 0,34$ , TCTP:  $1,87 \pm 0,46$  veces de inducción). En células infectadas, el tratamiento con metformina disminuyó la expresión de PTP1B con respecto a células infectadas sin tratar (PTP1B JFH1:  $5,51 \pm 0,91$ , JFH1 MET:  $3,98 \pm 0,34$  veces,  $p=0,045$ ), mientras que las expresiones de PTEN1 y TCTP siguieron aumentadas (Fig. 24).



**Figura 24.** Expresión génica de AKT, PTP1B, PTEN1 y TCTP modificada por la infección con JFH1 y el tratamiento con metformina (MET).

La expresión proteica de la vía de señalización de la insulina disminuyó al tratarse metformina, inhibiendo ésta a AKT, mTOR, PTP1B, PTEN1 y TCTP, mientras que aumentó los niveles de IRS1. Con la infección, el tratamiento con metformina disminuyó aún más los niveles de mTOR, AKT, PTP1B y TCTP (Fig. 25).

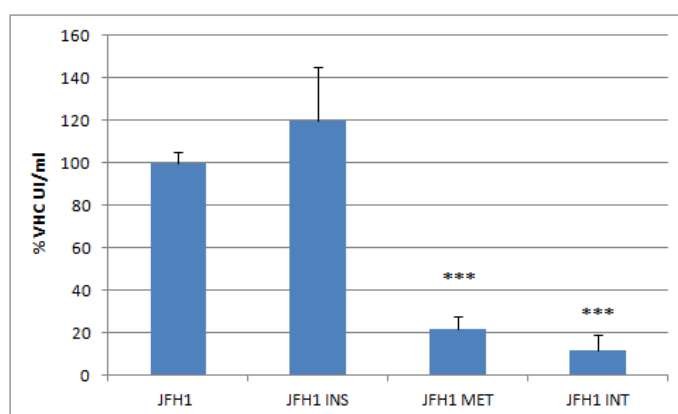


**Figura 25.** Expresión proteica de la vía de señalización de la insulina en células Huh7.5 tratadas con metformina (MET) e infectadas con JFH1. **A.** Imagen de Western-Blot. **B.** Cuantificación del Western-Blot

#### D.1.4.1. DISMINUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL TRATAMIENTO CON METFORMINA.

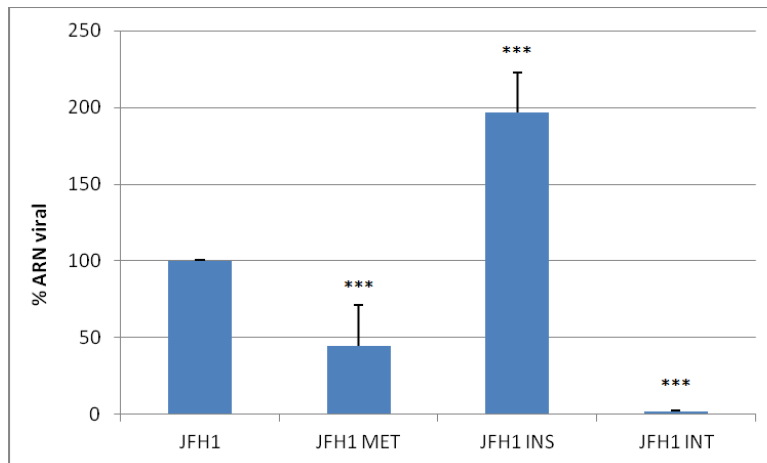
Para calcular la cantidad de partículas de JFH1 que se habían producido con los distintos tratamientos, se utilizó el COBAS® Taqman® HCV test v2.0. El número de copias libre de JFH1 que se produjeron en el medio de cultivo con el tratamiento con interferón disminuyó drásticamente, un  $88\% \pm 7,48$  de inhibición, con respecto a las células infectadas. El tratamiento con metformina también inhibió la producción viral en el medio, un  $78\% \pm 10,75$  con respecto a células infectadas sin tratamiento (Fig. 26).

Sin embargo, al comparar la eficacia en la inhibición del interferón con la metformina se observó cómo el número de copias de ARN viral en el medio de cultivo con metformina era casi el doble que con interferón ( $1,86 \pm 0,34$  veces más,  $p=ns$ ) (Fig. 26).



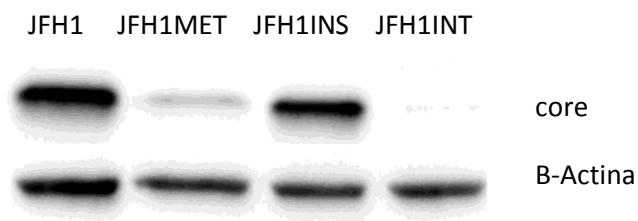
**Figura 26.** Porcentaje de partículas virales JFH1 en el medio de cultivo de células Huh7.5 tratadas con insulina (INS), metformina (MET) o interferón (INT).

La replicación viral se cuantificó, en las células infectadas, por qPCR con oligonucleótidos específicos para la cadena negativa del ARN viral. En células infectadas tratadas con insulina se duplicó la replicación, en comparación con células infectadas sin tratar. El tratamiento con interferón disminuyó cuantiosamente la replicación viral hasta tener un  $2\% \pm 0,34$  de ARN con respecto a las células infectadas, mientras que la metformina inhibió un  $55\% \pm 26,57$  la replicación viral (Fig. 27).



**Figura 27.** Porcentaje de ARN de polaridad negativa del virus de la hepatitis C en células infectadas con JFH1 tratadas con metformina (MET), insulina (INS) o interferón (INT).

También se cuantificó la expresión proteica de core en las células infectadas por la técnica western-blot. La insulina no modificó la expresión de core, mientras que la metformina disminuyó core  $5,98 \pm 0,37$  veces, es decir, un  $83,29\% \pm 1,04$  menos de proteína core comparado con el virus sin tratar. Con esta técnica, casi no se apreció core en las muestras tratadas con interferón (Fig. 28).



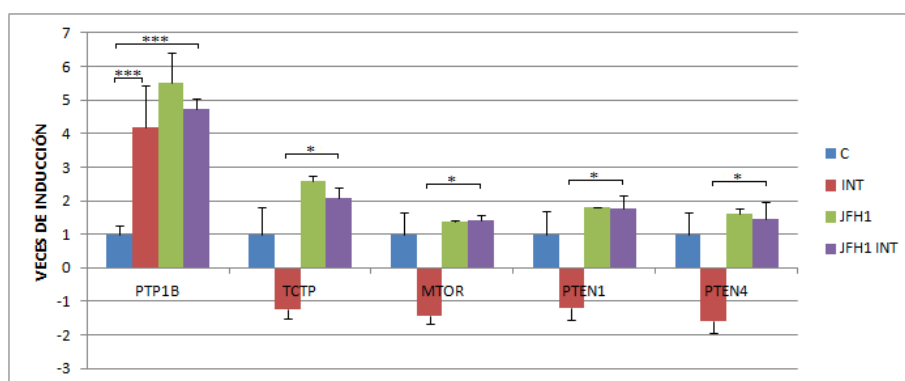
**Figura 28.** Expresión proteica de la proteína core del replicón JFH1 en células tratadas con metformina (MET), insulina (INS) o interferón (INT).

Titulando el virus de los medios de cultivo por inmunohistoquímica, se pudo observar cómo los medios de las células infectadas tratadas o no con insulina, infectaron la misma cantidad de células ( $TCDI_{50}V:1$ ,  $TCDI_{50}VINS:0,96 \pm 0,05$  veces). El medio recogido con interferón no tenía virus con capacidad infectiva, mientras que el medio tratado con metformina tenía  $9,9 \pm 3,4$  veces menos de  $TCDI_{50}$  que el virus.

### D.1.5. MODIFICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN CÉLULAS INFECTADAS TRATADAS CON INTERFERÓN.

Se utilizaron las células infectadas con el replicón vírico JFH1 y tratadas con interferón para cuantificar cómo variaba la vía de señalización de la insulina.

La expresión génica de PTP1B, mTOR, TCTP, PTEN1 y PTEN4, aumenta en las células infectadas y tratadas con dicho fármaco. Estos aumentos son debidos al efecto de la infección, a excepción del gen PTP1B cuya expresión génica aumentó por el tratamiento con interferón (Fig. 29). A nivel proteico, la vía de señalización de la insulina, no se vio afectada por el tratamiento con interferón.



**Figura 29.** Expresión génica de la vía de señalización de la insulina en células infectadas por JFH1 y tratadas con interferón (INT)



## D.2. EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y METFORMINA EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LÍNEAS DERIVADAS DE HEPATOCITOS.

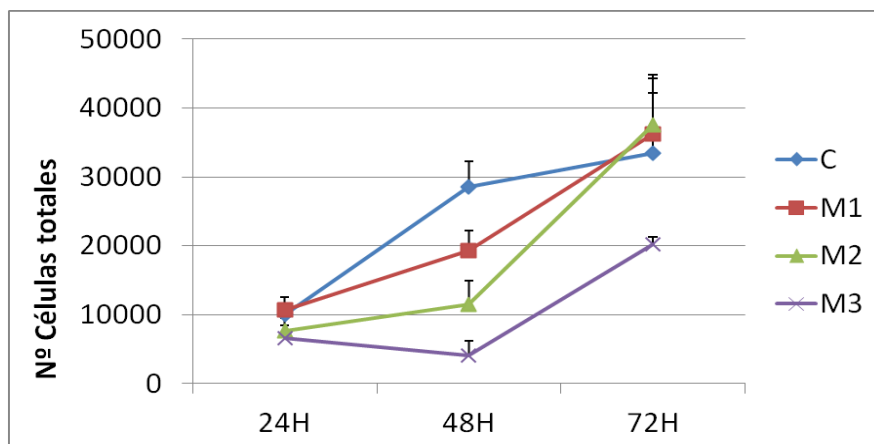
### D.2.1 ESTUDIO SOBRE LA LÍNEA CELULAR HEPG2

#### D.2.1.1. CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR CON EL TRATAMIENTO DE METFORMINA, SIMVASTATINAS O CONJUNTAMENTE.

##### D.2.1.1.1. METFORMINA

Las células se sembraron con la misma densidad para comprobar la viabilidad celular con diferentes dosis de metformina: 0,5 mM, 2mM y 10mM.

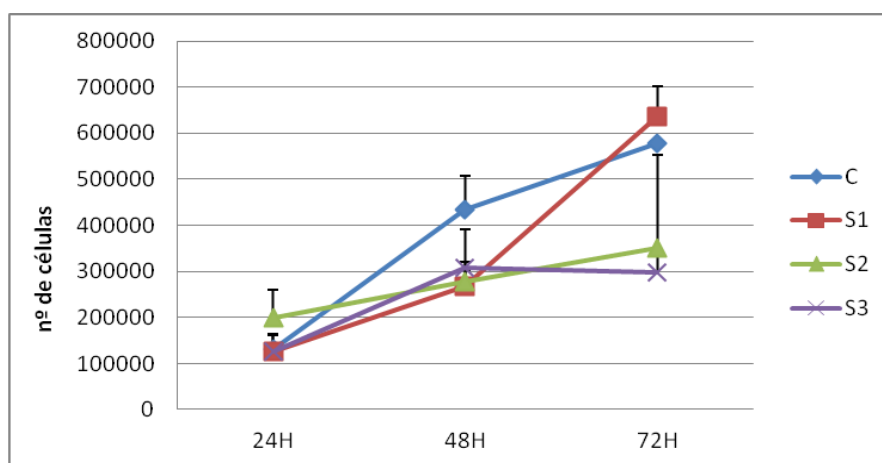
Las células HepG2 crecieron de manera proporcional cada 24 horas, pero al tratarse con metformina se observó que a las 48 horas disminuyó el número de células en todas las concentraciones de manera dependiente de la dosis. A 72 horas, mientras que las concentraciones más bajas alcanzaban el número de células del control, la metformina a 10mM inhibió la proliferación celular un  $40\pm 3,1\%$  con respecto a dicho control ( $p=0,04$ ) (Fig. 30).



**Figura 30.** Curva de viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratadas con metformina (M) a diferentes dosis: M1:0.5mM, M2:2mM, M3: 10mM.

### D.2.1.1.2. SIMVASTATINA

Se utilizaron tres concentraciones de simvastatina diferentes: 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M y 4 $\mu$ M para analizar la viabilidad celular. Las células HepG2 tratadas con simvastatina mostraron una disminución de la capacidad proliferativa a las 48 horas de manera independiente de la dosis. Sin embargo, a 72 horas aparecieron mayores diferencias, la concentración menor de simvastatina alcanzó los niveles de crecimiento de las células control, mientras que las concentraciones de simvastatina 2 y 4 $\mu$ M disminuyeron el número de células 39 $\pm$ 11,3% y 48 $\pm$ 8,6% (p=0,052) respectivamente (Fig. D 31).

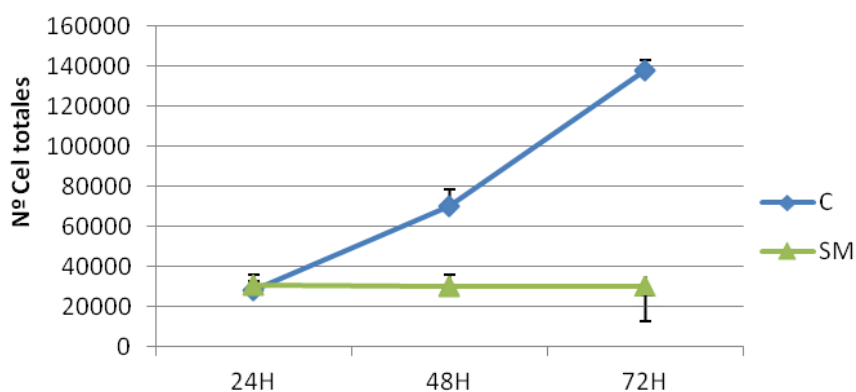


**Figura 31.** Curva de viabilidad celular en la línea celular HepG2 tratadas con simvastatina (S) a diferentes dosis: S1:1 $\mu$ M, S2: 2 $\mu$ M, S3: 4 $\mu$ M.

### D.2.1.1.3. COMBINACIÓN DE METFORMINA Y SIMVASTATINA

Quisimos comprobar si la combinación de los dos fármacos era capaz de inhibir la viabilidad celular en mayor medida que cada uno por separado. Las dosis elegidas para realizar la combinación de fármacos fue la dosis intermedia, para la metformina 2mM y para la simvastatina 2 $\mu$ M.

Las células HepG2 aumentaron su número proporcionalmente con el tiempo desde las 24 horas a las 72 horas. Al añadir el tratamiento doble con simvastatina y metformina el número de células a 48 horas no varió con respecto a las 24 horas; a las 72 horas se observó que el número de células es un 89%±10 menor que el control ( $p=0,001$ ) (Fig. 32).



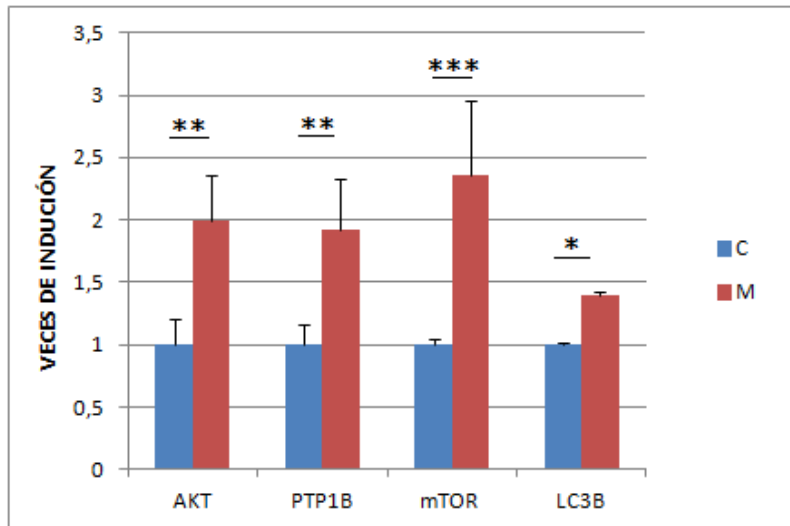
**Figura 32.** Curva de viabilidad celular de la línea HepG2 tratada con una combinación de simvastatina (S: 2  $\mu$ M) y metformina (2mM).

#### **D.2.1.1.4. MUERTE CELULAR**

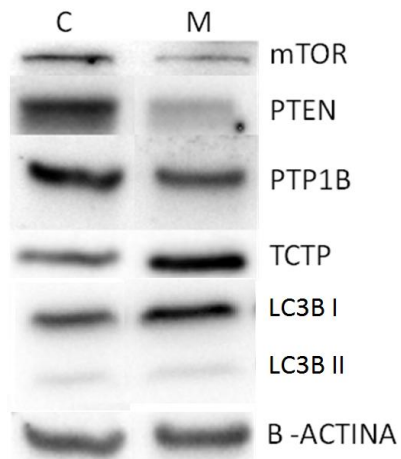
Tanto en los experimentos de la viabilidad celular con metformina y con simvastatina, como con ambas conjuntamente, se contabilizó el número de células muertas, no incrementándose las muertes por dosis ni por tiempo de exposición a los fármacos.

#### **D.2.1.2. VARIACIONES DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR TRATADAS CON METFORMINA.**

En células HepG2, la expresión génica de la vía de mTOR se modificó por la acción de la metformina, aumentando la expresión de los genes AKT, PTP1B, mTOR y LC3B (AKT:  $2,00\pm0,35$ , PTP1B:  $1,91\pm0,4$ , mTOR:  $2,36\pm0,59$ , LC3B:  $1,40\pm0,02$  veces) (Fig. 33). Sin embargo, las proteínas mTOR, PTEN y PTP1B disminuyeron por el tratamiento (mTOR:  $-2,21\pm0,26$ ; PTEN:  $-2,58\pm0,53$ ; PTP1B:  $-1,84\pm0,39$  veces) mientras aumentó la proteína TCTP y LC3BI (TCTP:  $1,77\pm0,44$ , LC3BI:  $1,54\pm0,15$  veces) (Fig. 34).



**Figura 33.** Expresión génica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con metformina (M 2mM) cuantificadas mediante qRT-PCR.



**Figura 34.** Expresión proteica de la vía mTOR de células HepG2 tratadas con metformina 2mM (M).

### D.2.1.3. MODIFICACION DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR POR EL TRATAMIENTO CON SIMVASTATINA.

En células HepG2 tratadas con simvastatina (2 $\mu$ M), las expresiones génicas de PTP1B, AKT, mTOR y DCTN4 estaban aumentadas (PTP1B: 1,84 $\pm$ 0,25, AKT:1,53 $\pm$ 0,16, mTOR:1,57 $\pm$ 0,23, LC3B: 1,4 $\pm$ 0,02, DCTN4: 2,02 $\pm$ 0,6 veces) (Fig. 35).

La expresión proteica de mTOR disminuyó con el tratamiento con simvastatina (-2,5 $\pm$ 0,30) (Fig. 36).

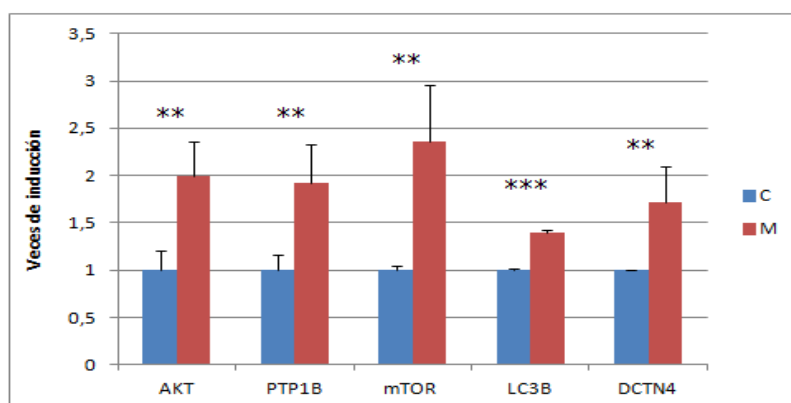


Figura 35. Expresión génica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina 2 $\mu$ M (S).

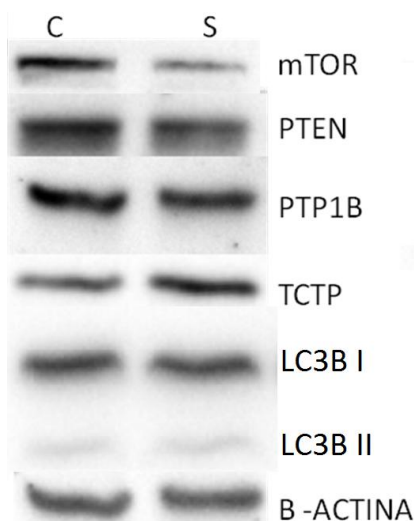
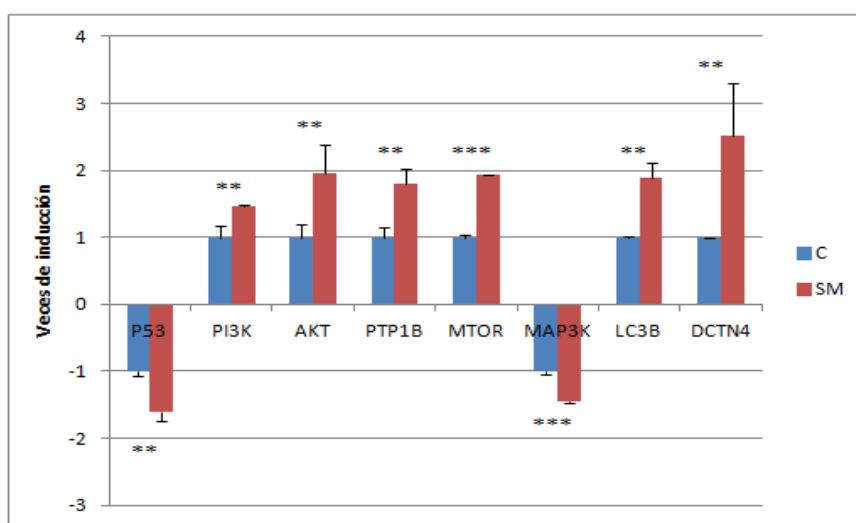


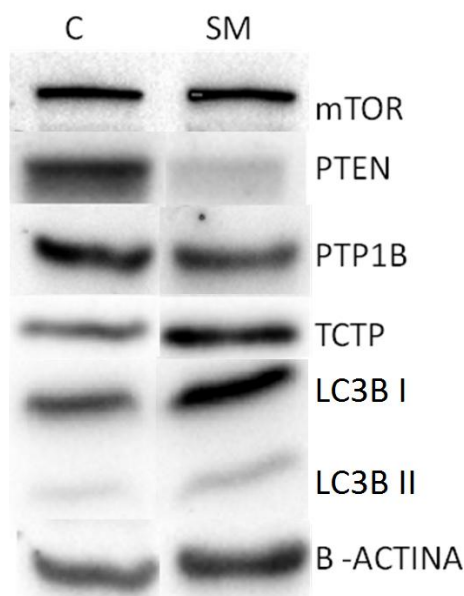
Figura 36. Expresión proteica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina 2 $\mu$ M (S) cuantificadas mediante Western-Blot.

#### D.2.1.4. EXPRESION DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR POR EL TRATAMIENTO CONJUNTO CON METFORMINA Y SIMVASTATINA.

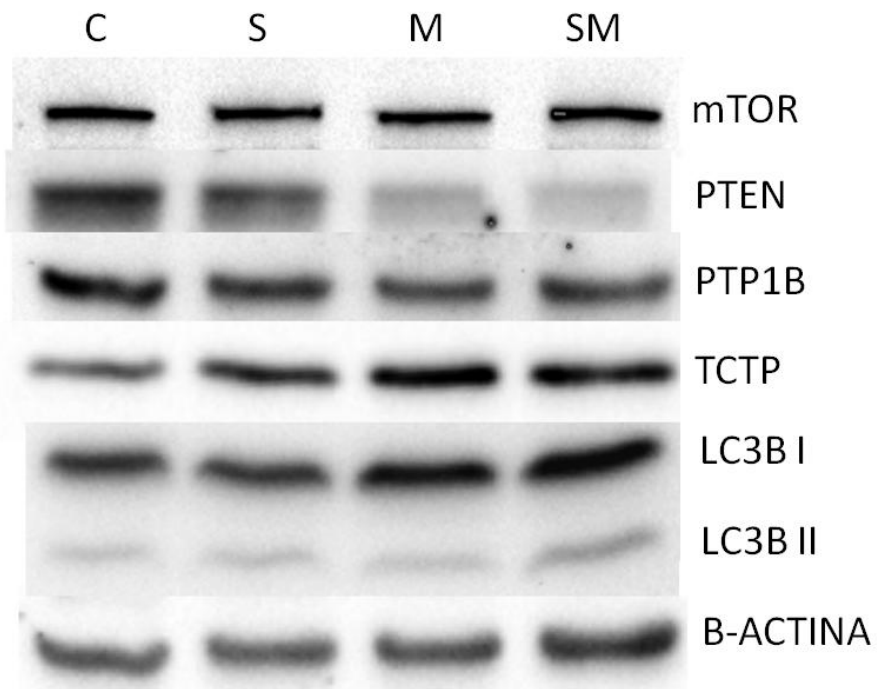
La expresión génica de PI3K, AKT, PTP1B, mTOR, LC3B y DCTN4 aumentó con el tratamiento conjunto de ambos fármacos, sin embargo, la expresión génica de p53 y MAP3K disminuyó (PI3K:1,46±0,004, AKT: 1,96±0,42, PTP1B: 1,80±0,21, mTOR: 1,92±0,01, LC3B: 1,88±0,22, DCTN4: 2,50±0,78, p53:-1,55±0,02, MAP3K: -1,45±0,01 veces) (Fig. 37). En cuanto a la expresión proteica, PTP1B y PTEN estaban disminuidas con el tratamiento conjunto de ambos fármacos (PTP1B: 1,8±0,37, PTEN: -2,18±0,22), mientras que LC3B I y II estaban aumentados (I: 2,18±0,15; II: 3.90±1,02) (Fig. 38).



**Figura 37.** Expresión génica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina (S 2µM) y metformina (2mM).



**Figura 48.** Expresión proteica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina (S 2µM) y metformina (M 2mM).

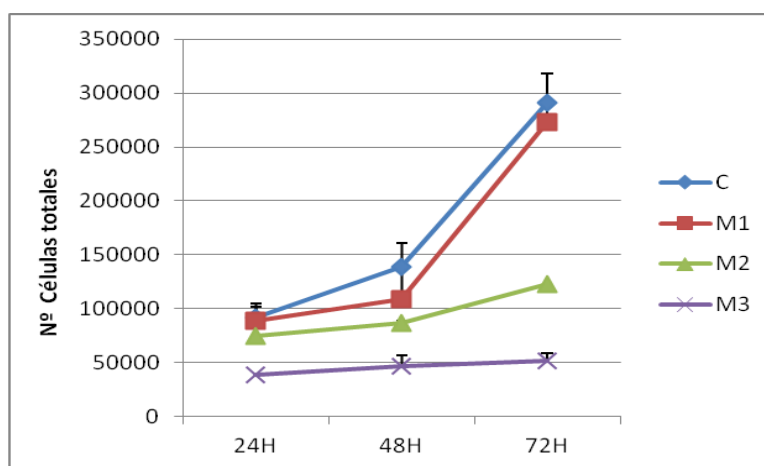


**Figura 39.** Expresión proteica de la vía mTOR en células HepG2 tratadas con simvastatina (S 2 $\mu$ M), metformina (M 2mM) o la combinación de ambas (SM, S: 2 $\mu$ M y M:2mM).

## D.2.2. ESTUDIO SOBRE LA LÍNEA CELULAR HUH7.5

### D.2.2.1. VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA CELULAR HUH7.5 TRATADA CON METFORMINA, SIMVASTATINA Y AMBAS CONJUNTAMENTE.

#### D.2.2.1.1. METFORMINA



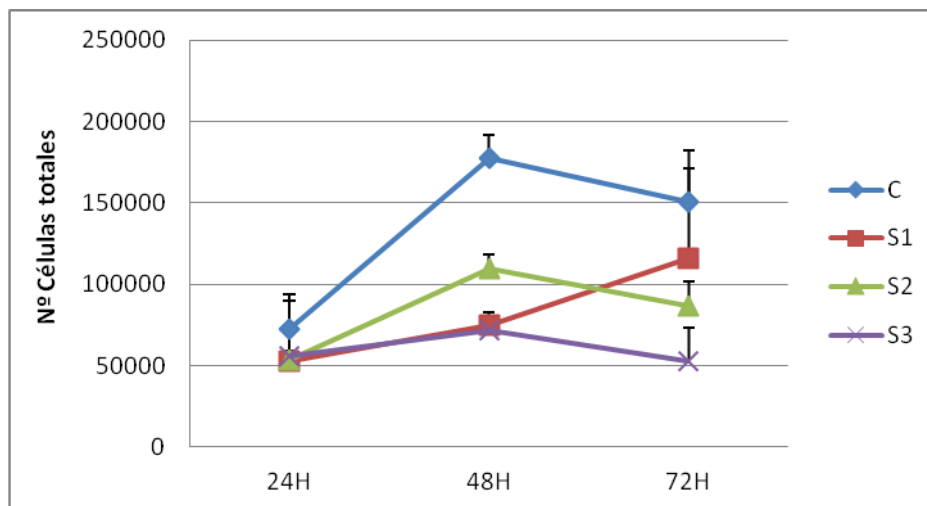
**Figura 40.** Viabilidad celular de la línea Huh7.5 tratada hasta 72 horas con diferentes concentraciones de metformina M1: 0,5mM, M2: 2mM, M3: 10mM.

Las células de la línea Huh7.5 se sembraron con la misma densidad para comprobar la viabilidad celular con diferentes dosis de metformina: 0,5 mM, 2mM y 10mM. La dosis más baja no modifica la dinámica de crecimiento celular, mas la metformina a concentración de 2 mM varía la curva de crecimiento tanto en 48 como en 72 horas, teniendo un 58% de células con respecto al control a las 72 horas ( $p=0,001$ ). Sin embargo, la disminución más evidente en el crecimiento celular es a la concentración máxima de metformina, donde no se observa proliferación celular (84% menos de células que el control a 72H,  $p=0,000$ ) (Fig. 40).



### D.2.2.1.2. SIMVASTATINA

Las línea celular Huh7.5 tratada con simvastatina tenía un comportamiento similar a las células HepG2. A las 48 horas existían diferencias en el número de células en todas las concentraciones de simvastatina con respecto el control. A las 72 horas, la concentración menor de simvastatina no tenía diferencias representativas con respecto al control, sin embargo, en las concentraciones mayores se observaron un menor número de células: a 2 $\mu$ M hay una disminución del 32 $\pm$ 11,8% de células y a 4 $\mu$ M un 58 $\pm$ 3,23% con respecto al control ( $p=0,047$  y  $p=0,000$  respectivamente) (Fig. 41).

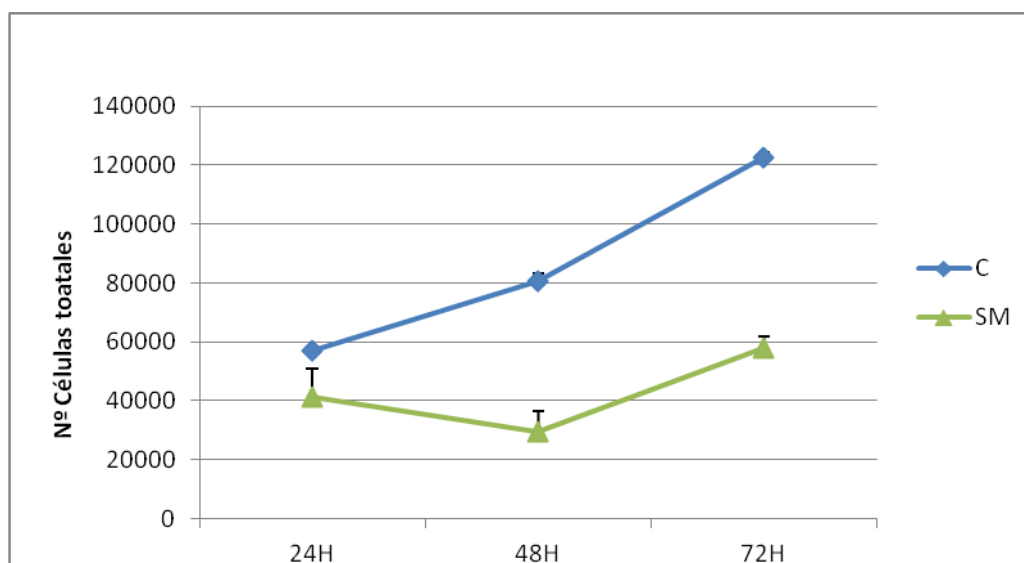


**Figura 41.** Curva de viabilidad celular en la línea celular Huh7.5 tratadas con simvastatina (S) a diferentes dosis: S1:1 $\mu$ M, S2: 2 $\mu$ M, S3: 4 $\mu$ M

### D.2.2.1.3. COMBINACIÓN DE SIMVASTATINA Y METFORMINA

Con la combinación de ambos tratamientos en la línea Huh7.5, se observó una dinámica diferente a la de la línea HepG2. Las células tratadas con ambos fármacos no

variaban a 48 horas ni a 72 horas el número de células con respecto a las 24 horas. En total se percibió una disminución del  $53\pm 3,23\%$  en estas células a las 72 horas comparado con el control ( $p=0,000$ ) (Fig. 42).



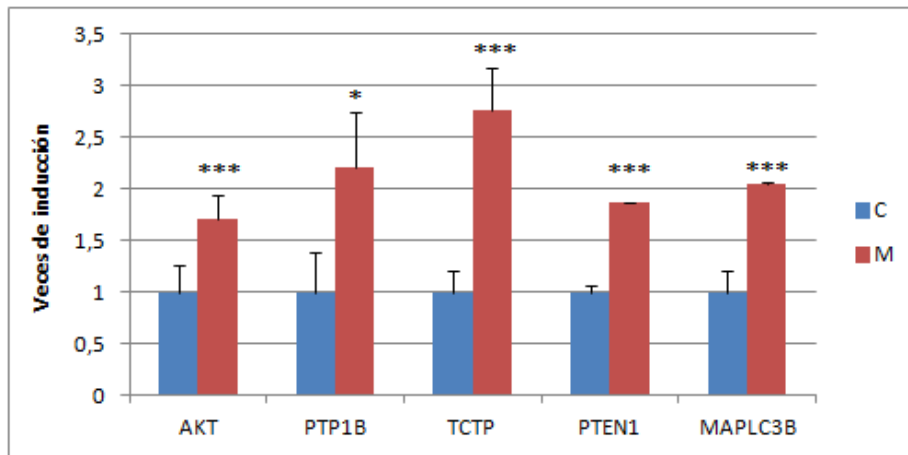
**Figura 42.** Curva de viabilidad celular de la línea Huh7.5 tratadas conjuntamente con simvastatina  $2\mu\text{M}$  y metformina  $2\text{mM}$ , hasta 72 horas.

#### **D.2.2.1.4. MUERTE CELULAR**

Al igual que en la línea celular HepG2, el número de células muertas en la línea Huh7.5 no aumentó con los tratamientos de simvastatina y/o metformina a diferentes dosis y tiempos.

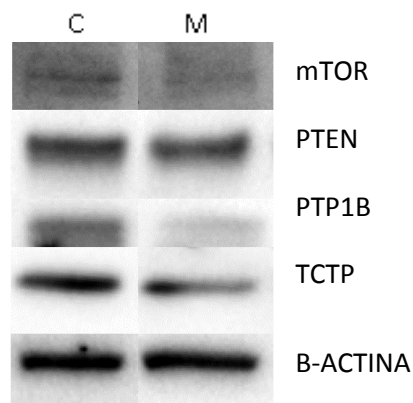
#### **D.2.2.2. VARIACIONES DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR EN LA LÍNEA CELULAR HUH7.5 TRATADA CON METFORMINA.**

En células Huh7.5, el tratamiento con metformina aumentó la expresión génica de AKT, TCTP, PTP1B, PTEN1 y LC3B (AKT:  $1,70\pm 0,24$ , PTP1B:  $2,21\pm 0,53$ ; TCTP:  $2,76\pm 0,40$ ; PTEN1:  $1,88\pm 0,006$  y LC3B:  $2,05\pm 0,03$  veces) (Fig. 43).



**Figura 43.** Expresión génica de la vía mTOR en células Huh7.5 tratadas con metformina 2mM (M) durante 72 horas.

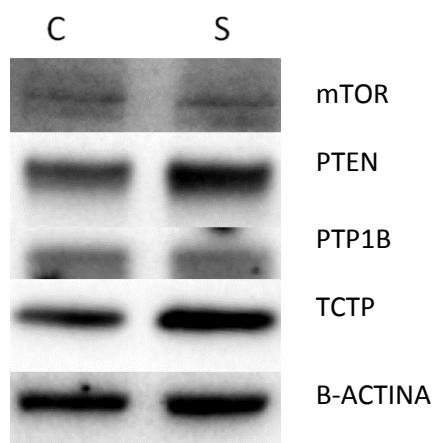
Como en células HepG2, la metformina produjo una disminución proteica en células Huh7.5 de mTOR y PTP1B (mTOR:  $-2,16 \pm 0,36$ , PTP1B:  $-1,64 \pm 0,2$  veces), pero también inhibió a TCTP ( $-1.92 \pm 0.19$  veces) (Fig. 44).



**Figura 44.** Expresión proteica de la vía mTOR en células Huh7.5 tratadas durante 72 horas con metformina 2mM (M).

### D.2.2.3. MODIFICACIÓN DE LA VÍA PI3K/AKT/MTOR POR EL TRATAMIENTO CON SIMVASTATINA.

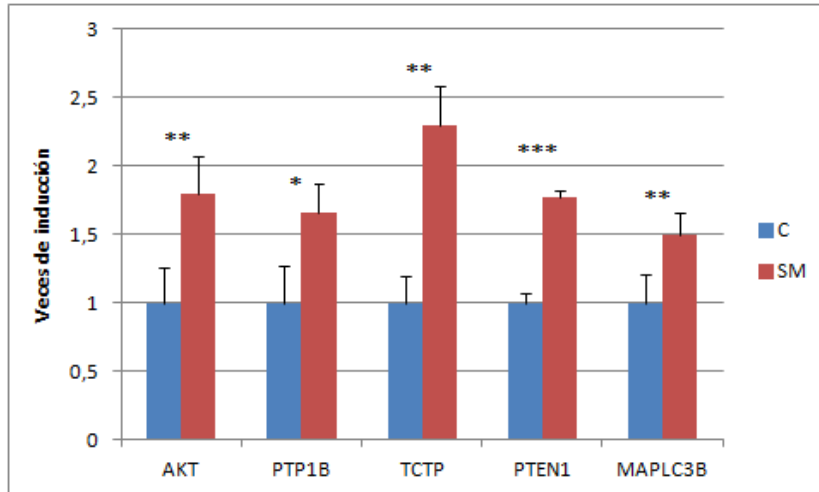
La simvastatina aumentó únicamente la expresión génica de PTP1B ( $1,48 \pm 0,17$   $p=0,047$ ). La expresión proteica de mTOR se encontraba disminuida con el tratamiento con simvastatina ( $-2,15 \pm 0,46$ ) al igual que en HepG2. Solo las células Huh7.5 presentaron un ligero aumento de TCTP y PTEN (TCTP:  $1,76 \pm 0,22$ , PTEN:  $1,54 \pm 0,027$ ) (Fig. 45).



**Figura 45.** Expresión proteica de la vía mTOR en células Huh7.5 tratadas con simvastatina  $2\mu\text{M}$  durante 72 horas.

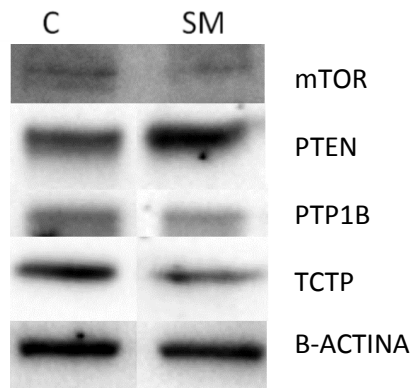
### D.2.2.4. VÍA PI3K/AKT/MTOR TRATADAS CON METFORMINA Y SIMVASTATINA.

En las células tratadas con metformina y simvastatina, la expresión génica de AKT, TCTP y PTEN1 estaba aumentada por el efecto de la metformina (AKT:  $1,79 \pm 0,27$ , TCTP:  $2,29 \pm 0,29$  y PTEN1:  $1,77 \pm 0,04$  y LC3B:  $1,49 \pm 0,11$  veces) (Fig. 46).

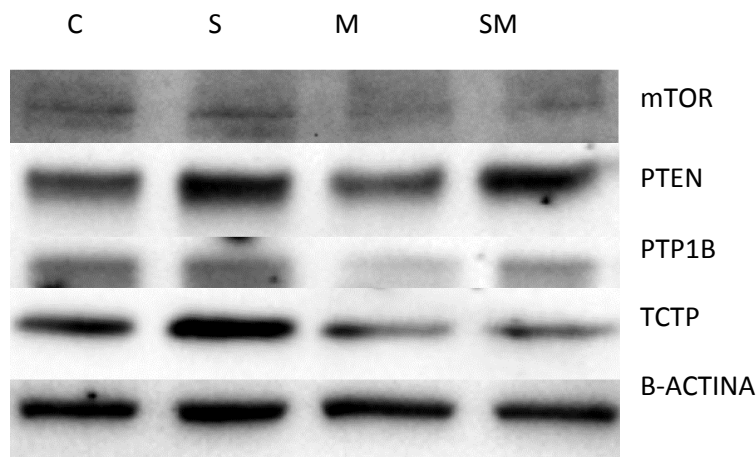


**Figura 46.** Expresión génica de la vía mTOR en células Huh7.5 tratadas con la combinación de simvastatina 2 $\mu$ M y metformina 2mM.

A nivel proteico, el tratamiento conjunto en Huh7.5 disminuyó mTOR y TCTP, y aumentó PTEN (mTOR:  $-2,56 \pm 0,89$ , TCTP:  $-1,89 \pm 0,37$ , PTEN:  $2,08 \pm 0,61$  veces) (Fig. 47).



**Figura 47.** Expresión proteica de la vía mTOR en células de la línea Huh7.5 tratadas con simvastatina (2 $\mu$ M) y metformina (2mM)



**Figura 48.** Expresión proteica de la vía mTOR en células Huh 7.5 tratadas con simvastatina (S 2 $\mu$ M), metformina (M 2mM) o la combinación de ambas (SM, S: 2 $\mu$ M y M:2mM).

#### D.2.2.5. LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C INDUCE CARCINOMA HEPATOCELULAR

El virus de la hepatitis C produce cambios en la célula infectada que induce un proceso tumoral. Hemos estudiado en un apartado anterior, cómo el virus aumenta la expresión proteica de los oncogenes mTOR y TCTP mientras que disminuye PTEN1, supresor de tumores (Fig. 21).

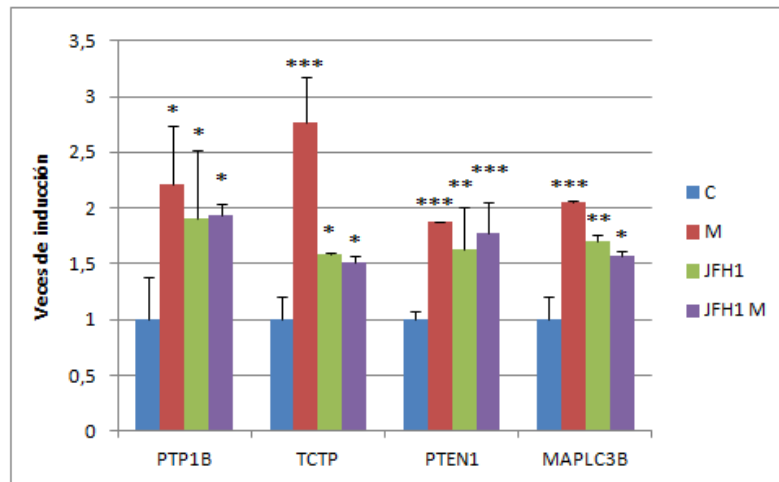
La autofagia es un proceso que puede llegar a producir la muerte de las células, incluso se ha llegado a llamar muerte celular programada tipo II. La proteína asociada a microtúbulo de cadena ligera 3 (LC3B) es conocida como una proteína fundamental para la autofagia. La infección por JFH1 aumenta dicha proteína en comparación con el control (3,67 $\pm$ 0,24) (Fig. 50).

#### D.2.2.6. DIFERENCIAS EN LA RUTA mTOR EN RESPUESTA A METFORMINA, PRODUCIDAS POR LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Para comprobar si el efecto de la metformina es diferente en los HCC producidos por VHC, tratamos con metformina las células infectadas con el replicón JFH1.

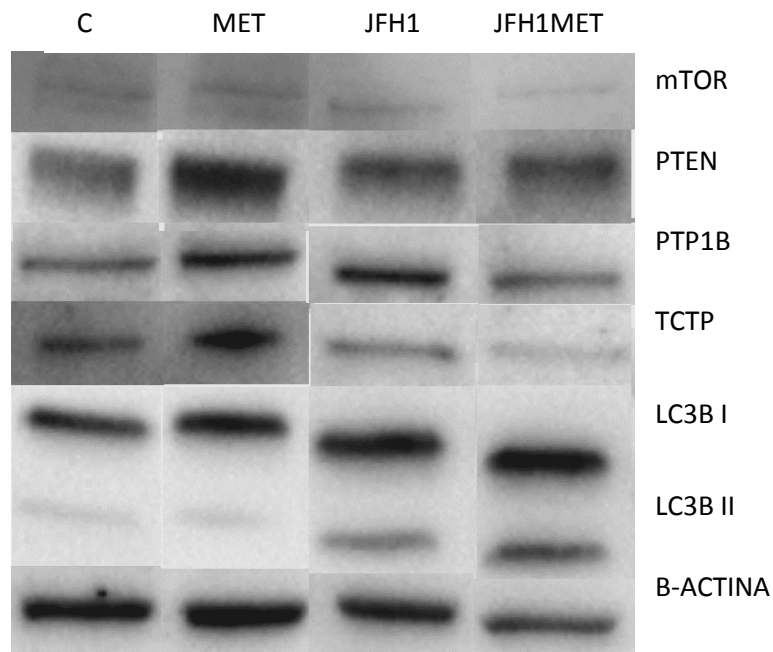
La respuesta a la metformina a nivel génica no cambió por la infección por JFH1, excepto en TCTP donde disminuyó la respuesta a la metformina en comparación con células

sin infectar tratadas con metformina ( $p=0,006$ ), aun así los niveles seguían siendo altos, comportándose como células infectadas (Fig. 49).



**Figura 49.** Expresión génica de la vía mTOR de células infectadas por JFH1 y tratadas con metformina (2mM) durante 72 horas.

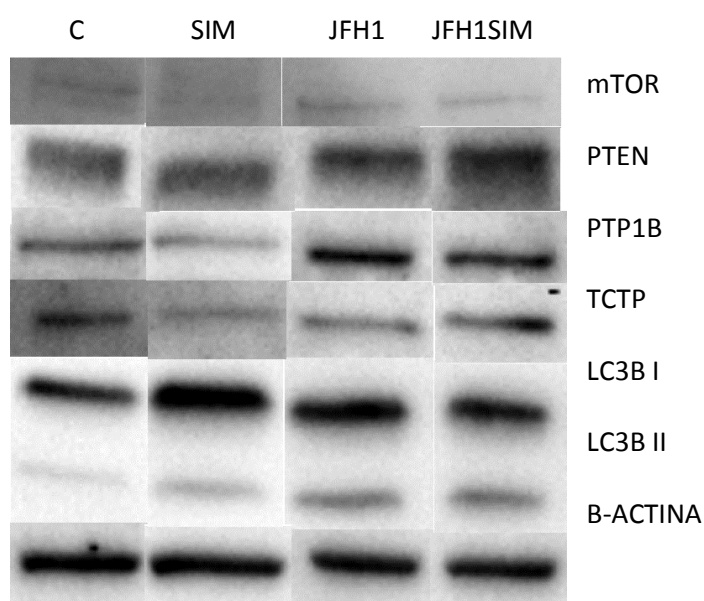
También la expresión proteica fue similar a células control con metformina, ya que TCTP, PTP1B y mTOR se encontraban disminuidas, además, PTEN1 se encontró más inhibido que en células infectadas. En cambio, la metformina aumentó la expresión de LC3BI y LC3BII, más que en células infectadas (Fig. 50).



**Figura 50.** Western-blot de las proteínas de la vía mTOR en células Huh7.5 infectadas por el replicón JFH1 y tratadas con metformina.

#### D.2.2.7. EFECTO DE LA SIMVASTATINA EN LA RUTA mTOR. INTERACCIÓN CON LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

Se trataron las células Huh7.5 infectadas con el replicón JFH1 con simvastatina, y como se observó anteriormente no se encontraron diferencias en cuanto a expresión génica. A nivel proteico, siguió disminuyendo mTOR y aumentando TCTP, pero PTEN1 disminuyó por el efecto del virus. (PTP1B aumento pero no sé si es por el virus) (Fig. 51).

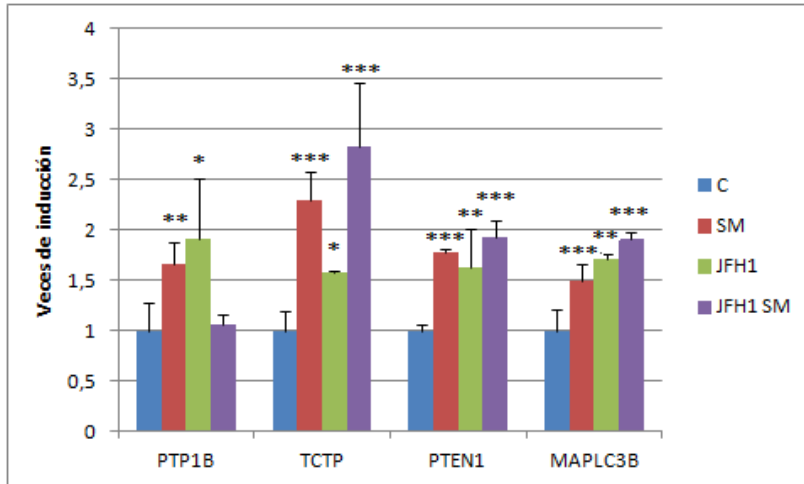


**Figura 51.** Western-blot de las proteínas de la vía mTOR en células Huh7.5 infectadas por el replicón JFH1 tratadas con simvastatina.

#### D.2.2.8. EFECTO DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C SOBRE EL EFECTO ANTINEOPLÁSICO DE LA COMBINACIÓN DE LA SIMVASTATINA Y METFORMINA

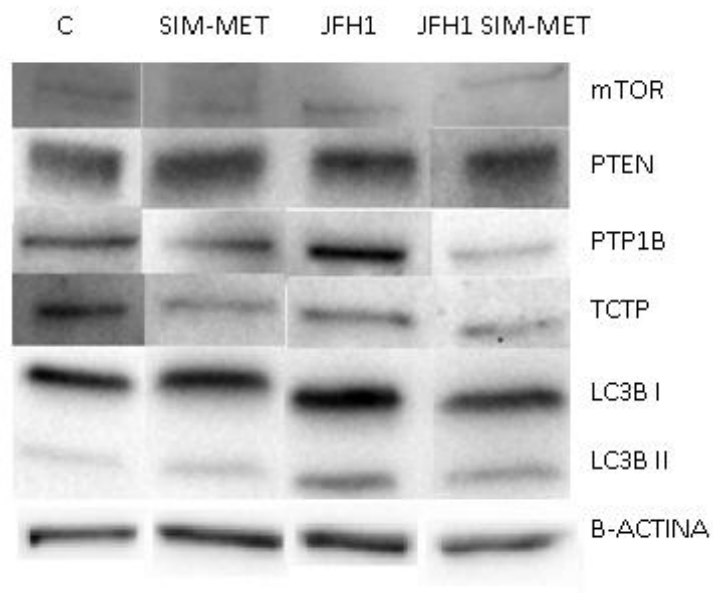
La combinación de ambos fármacos en células Huh7.5 infectadas con JFH1, inhibió la expresión génica de PTP1B producida por la metformina, a su vez TCTP revirtió la disminución de la metformina producida en células infectadas (Fig. 52).





**Figura 52.** Expresión génica de la vía mTOR en la línea celular Huh7.5 en células infectadas con JFH1, y tratadas con la combinación de simvastatina y metformina.

En cuanto a la expresión proteica, mTOR y TCTP siguió disminuida por la combinación conjunta de los fármacos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en células sin infectar tratadas con simvastatina y metformina, la expresión proteica de PTP1B disminuyó. Asimismo, se encontró que LC3BI y II aumentaba la expresión proteica por el tratamiento conjunto con simvastatina y metformina (Fig. 53).

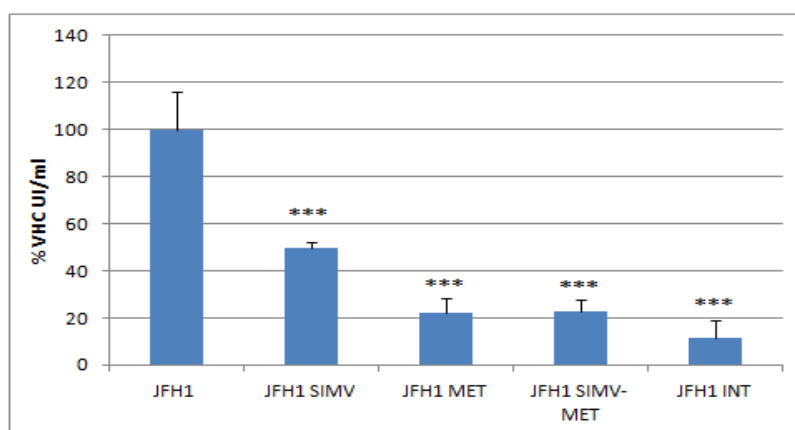


**Figura 53.** Expresión proteica de la vía mTOR en la línea celular Huh7.5 en células infectadas con JFH1 y tratadas con la combinación de simvastatina y metformina cuantificada mediante western-blot.

### D.2.2.9. EFECTO DE LA SIMVASTATINA Y SU COMBINACION CON LA METFORMINA SOBRE EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

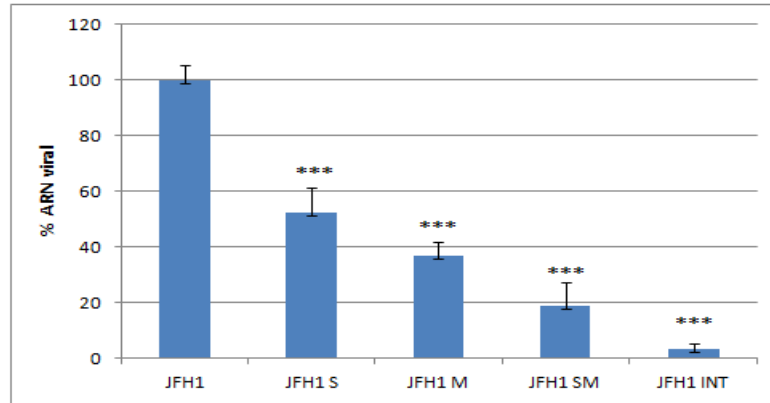
Para conocer cómo afectaría sobre la infección con VHC la combinación de simvastatina y metformina en pacientes con HCC, se trataron con dichos fármacos las células Huh7.5 infectadas con el replicón JFH1.

La producción de virus disminuyó con todos los tratamientos. La titulación del virus mediante el COBAS® Taqman® HCV test v2.0 demostró que la simvastatina disminuyó el ARN viral en el medio de cultivo un  $50\% \pm 2,59$ , mientras que la metformina y la combinación de los dos fármacos inhibió por igual la producción de virus (un  $77,5\% \pm 6,27$  y  $77,6\% \pm 5,5$  respectivamente) (Fig. 54).



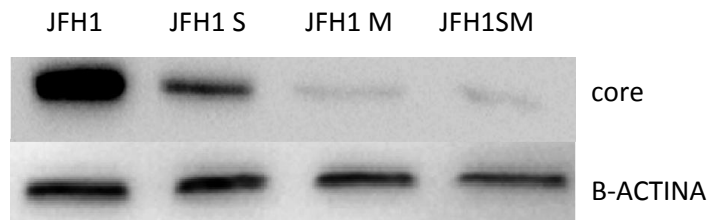
**Figura 54.** Porcentaje de disminución del virus producido en el medio de cultivo de las células infectadas por JFH1 tratadas con simvastatina  $2\mu\text{M}$ , metformina  $2\text{mM}$  y su combinación, cuantificado mediante PCR COBAS® Taqman® HCV test v2.0. Para control positivo se ha utilizado células infectadas y tratadas con interferón (INT).

La replicación viral también disminuyó con todos los tratamientos, la simvastatina disminuyó el ARN viral un  $47,6\% \pm 9,1$ , la metformina como anteriormente hemos demostrado un  $62,9\% \pm 5,1$ , y su combinación  $81,34\% \pm 8,7$ . Comparando la inhibición de la infección del interferón ( $96,6\% \pm 1,82$ ) con la combinación de la simvastatina y la metformina, no se observaron diferencias significativas  $p=\text{ns}$  (Fig. 55).



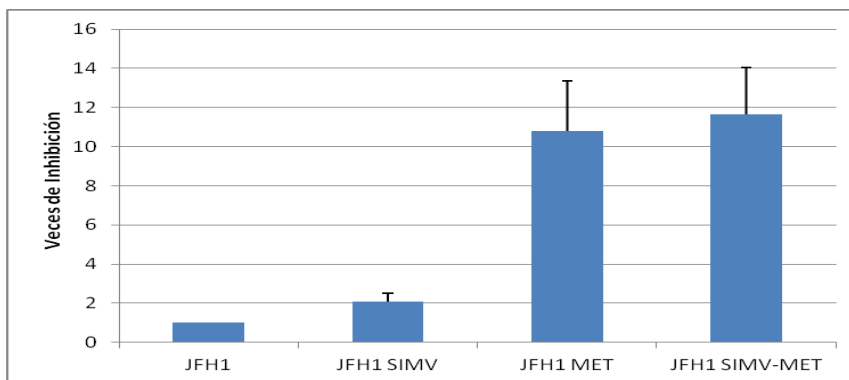
**Figura 55.** Disminución de la cantidad de ARN viral de polaridad negativa en células Huh7.5 tratadas con simvastatina 2µM, metformina 2mM y su combinación, medida por qPCR. Para control positivo se ha utilizado células infectadas y tratadas con interferón (INT)

La proteína core también se redujo con los tratamientos, la simvastatina disminuyó a más de la mitad esta proteína (3,12±1.62); mientras que la metformina y su combinación con la simvastatina disminuyeron la cantidad de esta proteína unas 38,51±3,5 y 60,0±10,0 veces de inhibición respectivamente(Fig. 56).



**Figura 56.** Western-blot de la proteína core del JFH1 en células Huh7.5 tratadas con simvastatina 2µM, metformina 2mM y su combinación.

La titulación del medio de cultivo de células infectadas con JFH1 y tratadas con ambos fármacos, mostró cómo el tratamiento con simvastatina inhibió la TCDI<sub>50</sub> a la mitad, mientras que la metformina la inhibía 10 veces, su combinación con la simvastatina no inhibió más la TCDI<sub>50</sub>(Fig. 57).



**Figura 57.** Gráfica representativa del número de veces que disminuye la TCDI<sub>50</sub> del medio de cultivo procedente de células infectadas con el replicón JFH1 y tratadas con los diferentes tratamientos de simvastatina (SIMV), metformina (MET) y la combinación de ambos (SIMV-MET) medida mediante inmunohistoquímica hacia core.

## D.2.3 ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTINEOPLÁSICA DE LA METFORMINA Y LA SIMVASTATINA EN HEPATOCITOS PRIMARIOS.

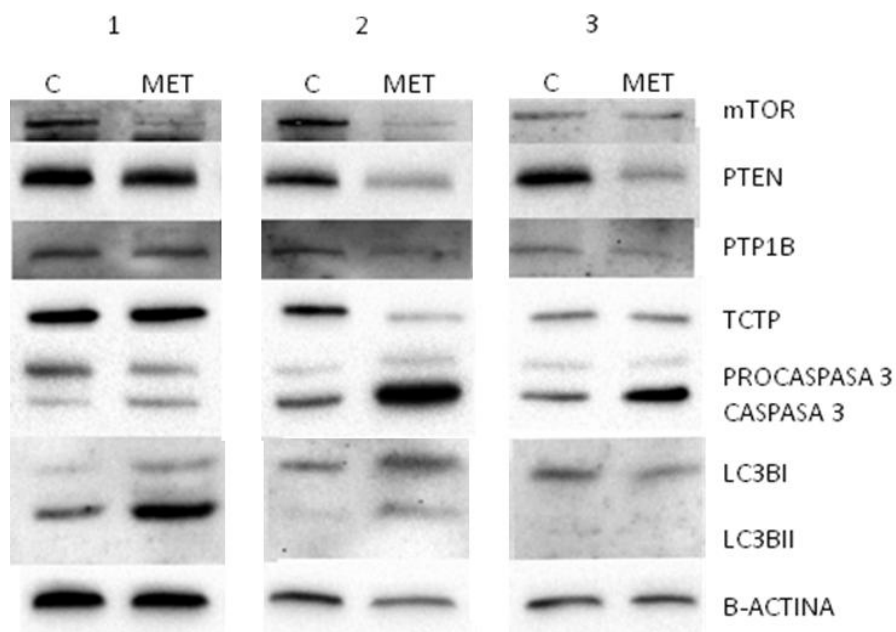
Gracias a la colaboración con el equipo de investigación del Dr. Padillo y Dr. Muntané de la unidad de cirugía oncológica, terapia celular y trasplante de órganos del Hospital Universitario Virgen del Rocío, pudimos realizar estos experimentos ya que nos proporcionaron los cultivos de los hepatocitos primarios.

### D.2.3.1 HEPATOCITOS PRIMARIOS TRATADOS CON METFORMINA.

Los hepatocitos primarios fueron tratados con metformina 2mM, tras 72 horas de tratamiento se extrajeron las proteínas totales de las células.

La metformina disminuyó la cantidad de mTOR y PTEN en los hepatocitos primarios. En cambio no se vio una disminución de PTP1B ni de TCTP por el tratamiento con metformina.

Los niveles de Procaspasa 3 no variaban, pero si se observó un efecto muy significativo de la Caspasa 3 (activa) en los hepatocitos tratados con metformina ( $4,05 \pm 2,56$ ). En cuanto a la cantidad de LC3B se observó un notable aumento de la fracción activa LC3BII en dos de los hepatocitos primarios tratados con metformina ( $5,64 \pm 4,2$ ) (Fig. 58).

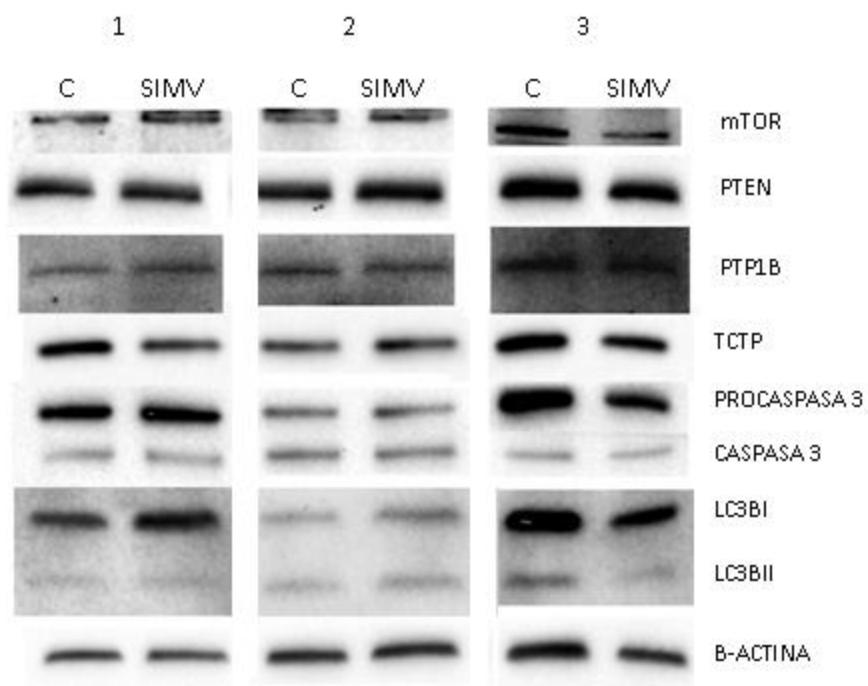


**Figura 58.** Expresión proteica de la vía mTOR en hepatocitos primarios procedentes de diferentes pacientes (enumeración), tratados con metformina 2mM (MET).

#### D.2.3.2 HEPATOCITOS PRIMARIOS TRATADOS CON SIMVASTATINA.

Los hepatocitos primarios se trataron con simvastatina a  $2\mu\text{M}$  durante 72H, posteriormente se recogieron las células y se extrajeron las proteínas totales.

El tratamiento con simvastatina en hepatocitos primarios no varió la expresión génica de la vía mTOR, aunque se aprecia un ligero aumento de LC3BI en dos de las muestras ( $1,76 \pm 0,02$ ), pero no se reflejó en un aumento de LC3BII (Fig. 59).



**Figura 59.** Expresión proteica de la vía mTOR en hepatocitos primarios procedentes de diferentes pacientes (enumeración), tratados con simvastatina 2 $\mu$ M (SIMV).

## **DISCUSIÓN**





## DISCUSIÓN

Es bien conocido cómo el virus de la hepatitis C está implicado en el desarrollo de alteraciones del metabolismo lipídico y glucídico<sup>89</sup>. De hecho, la resistencia a la insulina y la diabetes tipo II tienen una mayor prevalencia en pacientes con Hepatitis C que en la población general, y en muchos casos, cuando los pacientes alcanzan la respuesta viral sostenida estos síndromes suelen desaparecer<sup>59</sup>.

Las modificaciones del metabolismo glucídico en pacientes se han visto confirmadas en nuestros resultados tanto *in vivo* como *in vitro*. La infección con genotipo 1 del virus de la hepatitis C alteraba la expresión génica de la vía de señalización de la insulina en células PBMC. Los pacientes no respondedores a la doble terapia, tenían unos niveles de expresión génica más elevados de *MAP3K* y *mTOR*, que aquellos que alcanzaron la respuesta virológica sostenida. Estos últimos, por el contrario, tenían aumentada la expresión génica de *AKT*, *PTEN1* y *TCTP*.

Sin embargo, en un sistema *in vitro* con la línea celular de hepatocarcinoma humano Huh7.5 infectada con el replicón JFH1 genotipo 2, la expresión génica de la vía de señalización de la insulina no se modificaba, pero sí presentaba un aumento de la expresión génica de *TCTP* y de los inhibidores de la vía (*PTP1B*, *PTEN1*, *PTEN4*). Además, a nivel proteico se pudo apreciar una disminución de los niveles de PTEN, así como un aumento de mTOR y TCTP. El papel de PTEN en la infección con el virus de la hepatitis C ya ha sido descrita. En biopsias de hígado de pacientes infectados con genotipo 3, se observa una disminución de PTEN sólo en zonas donde la biopsia presenta esteatosis, sin embargo esta disminución no ha sido observada en biopsias de pacientes infectados con genotipo 1. La infección con un lentivirus que expresaba únicamente la proteína core 3a, permitió observar una disminución del 50% de la proteína PTEN<sup>90</sup>. Además, se ha visto aumentada la fosforilación de PTEN sugiriendo su inactivación en células infectadas con JFH1 y permitiendo la activación de la vía PI3K/AKT.<sup>91</sup>

El VHC activa la vía PI3K/AKT/mTOR<sup>92,93</sup>. La activación de PI3K genera fosfatidil inositol 3,4,5 trisfosfato (PIP3) necesario para el reclutamiento de AKT1 y PDK1 en las membranas, siendo además necesaria la fosforilación de AKT por PDK1<sup>94</sup>. PTEN produce la desfosforilación de PIP3 en la posición 3', generando fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato. Por tanto, una disminución de PTEN aumenta los niveles de PIP3, permitiendo un mayor anclaje de AKT y una mayor fosforilación en el residuo Thr308, estado más activo<sup>95</sup>. Este aumento en la actividad de AKT, hace que aumente la activación de mTOR, medida de manera indirecta por fosforilación en sus

sustratos 4E-BP1 y p70 S6K<sup>96</sup>. En este estudio hemos encontrado un pequeño aumento de mTOR en las células infectadas con el replicón JFH1 genotipo 2, pero no hemos llegado a estudiar su actividad sobre los sustratos.

La proteína TCTP está sobre-expresada en células Huh7.5 infectadas por el replicón JFH1 (Del Campo JA; resultados sin publicar). En colaboración con el CIC BioGUNE de Bilbao se realizó una cromatografía líquida conectado a un espectrómetro de masas, con el que se obtuvieron un conjunto de proteínas que incrementaban o disminuían considerablemente por la infección de JFH1, y entre ellas la proteína TCTP.

TCTP es una proteína antiapoptótica, antagonista de la proteína proapoptótica Bax<sup>96</sup>, que está sobreexpresada en la mayoría de las células tumorales. Su disminución reduce la viabilidad de estas células<sup>97</sup>. TCTP está regulado por PKR (double-stranded RNA (dsRNA)-activated protein kinase, PKR) y eIF-2 $\alpha$  (synthesis initiation factor 2, alpha subunit, eIF-2 $\alpha$ ), las cuales se activan por el interferón para promover la respuesta antiviral en la célula. La activación de ambas proteínas disminuyen la cantidad de TCTP estimulando la apoptosis celular. El VHC es capaz de regular a PKR por la proteína NS5A, la cual se une a diferentes regiones de PKR para inhibir su función quinasas<sup>98,99</sup>. Por tanto, al inhibirse la proteína PKR por NS5A, la proteína TCTP no solo no disminuye como medida antiviral celular, sino que esta aumentada según nuestros resultados, inhibiendo la apoptosis en los hepatocitos infectados.

Como se ha comprobado, la infección por virus C modifica la vía de señalización de insulina, por lo que la entrada de glucosa en la célula se ve impedida. Ante un aumento de glucosa en la sangre, el páncreas aumenta la producción de insulina para recuperar la concentración correcta de glucosa. Por esta razón muchos pacientes con hepatitis C tienen altos niveles de insulina en sangre<sup>100</sup>. Estos niveles altos de insulina podrían modificar de nuevo la vía de señalización de esta hormona en pacientes infectados.

En nuestros experimentos se trataron con insulina células Huh7.5 infectadas con JFH1, observándose una disminución de los niveles de PTEN y AKT. PTEN disminuye para mejorar la activación de la vía de señalización de la insulina, de hecho en ratones ob/ob la inhibición de PTEN disminuía la concentración de insulina en plasma, y aumentaba las fosforilaciones de AKT en el hígado en respuesta a dicha hormona<sup>101</sup>. Sin embargo, se ha encontrado una disminución en los niveles de AKT en células infectadas y tratadas con insulina. La disminución de AKT en las células musculares y en los adipocitos, aumenta la hiperglicemia, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa y la disminución de la entrada de glucosa en la célula<sup>102</sup>. Por lo tanto, la disminución de AKT nos puede llevar a pensar, que sólo con la disminución de PTEN en dichas células no es suficiente para revertir los cambios en la vía producida por la infección. De

hecho, en líneas celulares de hepatocarcinoma donde se expresaba core 3a se ha observado una disminución de PTEN, pero no se encontró un aumento de la actividad de AKT<sup>91</sup>. También se ha observado que la infección por JFH1 disminuyó la actividad de AKT ya que no se fosforilaba en Thr308, independientemente de si se había tratado o no con insulina, lo cual inhibía la entrada de glucosa en las células<sup>103</sup>.

La metformina es un fármaco comúnmente usado para tratar la resistencia a la insulina, incluso en pacientes infectados con el VHC<sup>61</sup>. En este estudio hemos investigado cómo la metformina afecta a la vía de señalización de la insulina cuando las células de la línea celular de carcinoma hepatocelular estaban infectadas. En general, las proteínas de la vía de señalización de la insulina se encuentran disminuidas (mTOR, AKT, PTP1B, y TCTP) a excepción de IRS1.

La metformina ejerce su función en la vía de señalización de la insulina por la activación de AMPK, que activando a TSC1 y TSC2, e inhibiendo a Rheb, produce la inactivación de mTOR. Al inhibirse mTOR, p70S6K1 no fosforila en serina a IRS1 y por tanto vuelve a ser activa<sup>104</sup>. Nosotros hemos observado una disminución de mTOR en el tratamiento con metformina en células con y sin infección, y un aumento de IRS1 discreto en células sin infectar, aunque mayor en células infectadas. Asimismo, PTP1B (proteína que inhibe tanto a IR como a IRS1) se encuentra disminuida en células tratadas con metformina, indicando una menor inhibición sobre la vía. En células HepG2 y en ratones ob/ob con resistencia a la insulina y tratados con metformina, se observaba una disminución de la actividad de PTP1B<sup>105</sup>. La disminución de PTP1B parece ser postranscripcional, ya que la expresión génica de PTP1B está aumentada por el tratamiento con metformina.

La metformina también actúa sobre AKT, pues disminuye su expresión proteica, sobre todo en células infectadas. Esta disminución puede ser a priori un poco contradictoria, ya que se ha descrito que un defecto en AKT es suficiente para producir resistencia periférica a la insulina, y dicha resistencia es un catalizador para la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, la producción de insulina hepática y la progresión de la enfermedad<sup>106</sup>. Sin embargo, la metformina es capaz de activar a AS160 por la activación de AMPK, que independientemente de AKT, es capaz de transportar a Glut4 a la membrana plasmática en tejido muscular, y por tanto una disminución de AKT no afecta a la activación del transporte a la membrana de Glut4<sup>108</sup>. Además, esta misma disminución de AKT por la metformina se ha descrito tanto en células de cáncer de páncreas como en células de cáncer de mama<sup>107,108</sup>. Por último, TCTP también disminuye por el tratamiento con metformina, pudiendo permitir a las células infectadas activar la apoptosis en respuesta antiviral.

Además del efecto sobre la vía de señalización de la insulina, la metformina tiene un efecto antiviral. *In vitro*, se observa una disminución en la cantidad de virus producido de alrededor de un 80%, un 50% menos de replicación y casi 10 veces menos de TCDI<sub>50</sub> o capacidad de infectar un 50% de las células del virus producido por células tratadas con metformina. *In vivo*, un metanálisis demuestra un aumento de los niveles de respuesta viral sostenida en pacientes tratados con doble terapia: interferon- $\alpha$  2a y ribavirina<sup>109</sup>. Nuestros resultados *in vitro* vienen a confirmar los estudios realizados en pacientes.

En este mismo metanálisis, se demuestra cómo la metformina en pacientes con diabetes mellitus tipo II no solo inhibe o retrasa la aparición de carcinoma hepatocelular, sino que también disminuye la necesidad de trasplante hepático y la muerte causada por daño en el hígado<sup>109</sup>. Incluso en un estudio retrospectivo, tienen un mayor ratio de supervivencia aquellos pacientes con diabetes mellitus tipo II y hepatocarcinoma a los que se trataron por ablación por radiofrecuencia y que siguieron tomando metformina<sup>109</sup>. Ante estos datos tan interesantes, decidimos estudiar el efecto de la metformina como retardador del carcinoma hepatocelular en la vía PI3K/AKT/mTOR. Dicha vía es una buena diana contra el cáncer, porque es la ruta de señalización principal de los receptores tirosina quinasa que regulan numerosas vías: proliferación, supervivencia, diferenciación, migración y apoptosis<sup>110</sup>.

Los estudios *in vitro* demostraron que la metformina disminuía la viabilidad celular a medida que aumentaba la dosis y el tiempo de tratamiento, teniendo un mayor efecto sobre la línea celular Huh7.5 que sobre la línea HepG2. Esta disminución también había sido descrita en células Huh1 y Huh7<sup>111</sup>. Los efectos tanto a nivel génico como proteico de la metformina sobre las líneas HepG2 y Huh7.5 se observaron bastante parecidos, ambas disminuyeron la expresión proteica de mTOR, PTP1B y PTEN. Sin embargo, en la línea HepG2 la metformina incrementó los niveles de TCTP mientras que en células Huh7.5 se encontró disminuido.

La disminución de mTOR producida por la metformina ya ha sido comentada anteriormente, se debe a la inhibición producida por la AMPK activa. Esta disminución es muy beneficiosa para inhibir el proceso tumorigénico, ya que la vía mTOR está activa por muy diversos mecanismos en muchos tipos de cáncer, pues es una vía reguladora de varios procesos oncogénicos incluido crecimiento celular, proliferación, metabolismo y angiogénesis<sup>110</sup>.

Sin embargo, la disminución de los genes supresores de tumores PTP1B y PTEN debida a la metformina aun siendo beneficiosa para el tratamiento de la resistencia a la insulina, no es ventajosa para disminuir la oncogénesis pues aumentaría la activación de la vía mTOR<sup>112</sup>. PTEN es un gen supresor de tumores muy estudiado y en alrededor del 50% de los HCC se encuentra inactivo<sup>73</sup>. Mientras que PTP1B es el primer inhibidor de la cascada de señalización de los

receptores tirosina quinasas y regula sus fosforilaciones<sup>113</sup>. PTP1B tiene un efecto controvertido en la progresión del tumor, pues en cáncer de mama, colon y próstata promueve su progresión pero en cáncer esofágico y en linfomas actúa como gen supresor de tumores<sup>114</sup>. En HCC, PTP1B está disminuido en el tejido tumoral al ser comparado con el tejido no tumoral adyacente, y parece actuar como supresor de tumores ya que una baja expresión de PTP1B se asocia a un peor pronóstico<sup>113</sup>. Sin embargo, en hepatocitos primarios humanos no se observó una disminución de estas dos proteínas por el tratamiento con metformina.

TCTP es una proteína que está siendo estudiada en cáncer por tener muchos efectos oncogénicos, ya que no solo es una proteína antiapoptótica, sino que además degrada a p53 por medio de la ubiquitinación de MDM2<sup>115</sup>, aumenta la producción de citoquinas lo cual genera una mayor inflamación en el tejido y acelera la progresión del ciclo celular generando mayor cantidad de mutaciones ya que no permite la reparación de los fallos en la copia del ADN en la fase S<sup>116</sup>. Además, se ha descrito como una disminución de TCTP es capaz de revertir masivamente el estado oncogénico celular en cáncer de mama incluso con p53 mutado<sup>115</sup>. Por tanto, la inhibición de TCTP supondría un beneficio a la hora del tratamiento del tumor. Curiosamente, el efecto de la metformina es diferente según la línea celular, en HepG2 el tratamiento con metformina aumenta la cantidad de TCTP pero en Huh7.5 disminuye. Así mismo, en hepatocitos primarios, la metformina no parece que modificar la expresión de esta proteína.

La simvastatina es otro fármaco comúnmente usado en práctica clínica que protege contra el cáncer de hígado y facilita su curación. Por metanálisis se ha demostrado que el uso de simvastatina disminuía un 37% el riesgo de desarrollar un carcinoma hepatocelular<sup>81</sup>. Además el uso de la simvastatina después de un diagnóstico de HCC, y el tratamiento indicado en cada caso, aumentó la supervivencia total un 66%<sup>76</sup>. Por eso quisimos analizar el efecto de la simvastatina en un sistema *in vitro* para conocer los efectos sobre la vía mTOR por lo que se podría disminuir el riesgo de desarrollo de HCC.

El tratamiento con simvastatina a dosis crecientes, disminuyó la viabilidad celular tanto en la línea HepG2 como en Huh7.5, pero con menor efecto que el tratamiento con metformina. Esta disminución ha sido descrita pero con mayores dosis de simvastatina, siendo más susceptible a dicho fármaco la línea celular HepG2<sup>83</sup>. La simvastatina produjo efectos diferentes sobre la vía mTOR en las dos líneas celulares, ocasionando mayores cambios sobre la línea Huh7.5, aunque en hepatocitos primarios humanos no pareció cambiar la expresión de ninguna de las proteínas estudiadas de la vía mTOR.

Al igual que la metformina, la simvastatina disminuyó la proteína mTOR en ambas líneas celulares (única proteína que cambia a la vez en las dos líneas). La disminución de mTOR por el efecto de la simvastatina ha sido descrito en otros tejidos, pero nunca en hígado<sup>117</sup>.

En la línea HepG2 no se observaron más cambios por el tratamiento con simvastatina en ninguna de las proteínas aquí estudiadas, pero en la línea celular Huh7.5 si se encontraron diferencias ya que las proteínas PTEN y TCTP aumentaron por la simvastatina. Como anteriormente hemos indicado, el aumento de PTEN es un hecho beneficioso pues actúa como gen supresor de tumores en HCC, sin embargo el aumento de TCTP es un efecto negativo en cuanto su contribución en el desarrollo del cáncer.

La combinación de simvastatina y metformina se ha estudiado en cáncer de próstata observándose una menor viabilidad celular con el tratamiento conjunto que con cada uno por separado<sup>118</sup>. Desafortunadamente, en nuestro estudio no hemos encontrado un comportamiento homogéneo en las dos líneas celulares. En HepG2, había una menor viabilidad celular con el tratamiento conjunto de ambos fármacos que por separado, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, en Huh7.5 no había diferencias entre la viabilidad de células tratadas con metformina y la viabilidad de células tratadas por ambos fármacos.

El efecto de la combinación de ambos fármacos sobre la expresión proteica es diferente también en ambas líneas celulares, mientras que en HepG2 sólo disminuían los supresores de tumores PTP1B y PTEN1, en Huh7.5 las proteínas PTP1B, mTOR y TCTP estaban disminuidas, y PTEN aumentada. A pesar de que en la línea celular Huh7.5 no se encontraran diferencias de viabilidad celular entre las células tratadas con la combinación de simvastatina y metformina, y las células tratadas con metformina, la combinación de los dos fármacos sigue siendo interesante, pues inhibe a la vez la vía de proliferación celular al disminuir mTOR y aumentar PTEN, y activa las señales de apoptosis al inhibir TCTP.

Se quiso comprobar si en células infectadas por el virus de la Hepatitis C se mantenían los efectos de la simvastatina y la metformina, para ello se infectaron las células de la línea celular Huh7.5 con el replicón JFH1. El virus de la hepatitis C promueve la tumorigénesis por generar un estado inflamatorio continuo que produce inestabilidad génica no cromosómica<sup>119</sup>. Por la continua replicación del virus, las proteínas virales activas interaccionan con proteínas celulares para inhibir la respuesta inmune celular y promover la supervivencia, generando además un estado inflamatorio en el hígado que con el paso del tiempo (por ser una enfermedad silente) termina produciendo cirrosis hepática<sup>120</sup>. En concreto, la infección con JFH1 produce cambios en la vía mTOR como hemos señalado anteriormente (aumento de mTOR y TCTP, y disminución de PTEN).

Los tratamientos con simvastatina y metformina por separado continúan produciendo los mismos cambios en las células infectadas. Asimismo, en Huh7.5 infectadas con JFH1, la combinación de ambos fármacos tiene efectos similares a aquéllos observados en las células controles con tratamiento. De hecho, sigue disminuyendo mTOR, TCTP y PTP1B, pero en vez de aumentar PTEN1, consigue una reversión de la disminución producida por la infección, y su expresión vuelve a los niveles de PTEN de células control.

Asimismo, se comprobó si el uso de la simvastatina en combinación con la metformina podía mejorar la inhibición del virus de la hepatitis C. Las estatinas disminuyen la infección por virus C tanto en pacientes con doble terapia<sup>121</sup> como en experimentos *in vitro*<sup>122</sup>. En nuestros resultados, la simvastatina por sí misma, es capaz de disminuir tanto los niveles de la proteína core como la replicación, y por tanto la cantidad de virus producido, pero con menor eficacia que la metformina. Sin embargo, cuando se añadían los dos fármacos conjuntamente al medio de cultivo, se podía observar una menor cantidad de core y una replicación viral menor (sin diferencias significativas con el interferón) en comparación con la metformina, aunque no se observaron diferencias en la cantidad de virus producido.

La autofagia es un mecanismo de supervivencia celular que en condiciones de ayuno obtiene nutrientes por la degradación y reciclado de componentes celulares, lo que permite a la célula sobrevivir en condiciones de estrés<sup>123</sup>. Durante la autofagia, porciones del citosol (incluyendo orgánulos) se engloban en una doble membrana que se cierra para formar el autofagosoma o vacuola de autofagia, donde se produce la digestión de los componentes englobados<sup>124</sup>. En hepatocitos, por los bajos niveles de lipasas en sus citoplasmas, la autofagia está implicada en la rápida movilización de lípidos<sup>125</sup>.

La hepatitis C aumenta una autofagia incompleta al inducir la acumulación de autofagosoma, pero no incrementa las proteínas degradadas por autofagia en biopsias hepáticas, no obstante en sistemas *in vitro* el proceso de autofagia se completa<sup>126</sup>. En este estudio hemos observado, en células infectadas, un aumento sólo de LC3BII (fragmento unido al autofagosoma) pero no de LC3BI citoplasmática e inactiva. Se ha descrito que VHC induce la autofagia para mejorar el traslado del ARN viral entrante, y para la supresión del sistema inmune antiviral innato, todo ello estudiado en condiciones donde la autofagia era inhibida<sup>125</sup>. Pero parece que este proceso en células infectadas es selectivo hacia los lípidos, ya que no se ha encontrado colocalización de los autofagosomas con el retículo endoplasmático ni con el aparato de Golgi. Las células infectadas producen mayor cantidad de colesterol, y la inhibición *in vitro* de esta síntesis produce una disminución de los niveles de autofagia<sup>125</sup>. Por tanto, se

podría especular que los efectos en el sistema antiviral cuando se impide la autofagia se deben a una acumulación de colesterol en las células<sup>125</sup>.

Por otro lado, se ha observado una correlación inversa entre la presencia de microvesículas de esteatosis y la activación de la autofagia en biopsias de pacientes infectados con el genotipo 3, pero esta correlación no se encontró en pacientes con NAFLD o infectados por el virus de la hepatitis B<sup>125</sup>. Por tanto, parece que la autofagia lucha contra la producción de lípidos incontrolada inducida por la hepatitis C y por tanto, los fármacos que aumentan la autofagia podrían prevenir los daños causados por la acumulación excesiva de lípidos en pacientes infectados<sup>125</sup>.

En un estudio realizado en un modelo de esteatosis hepática donde las células HepG2 se cultivaban con ácido oleico y glucosa, las células presentaban acumulaciones de lípidos y se producía una autofagia incompleta, suceso que se asemeja a la infección con el VHC<sup>127</sup>. Estas células con el tratamiento con metformina aumentaban el ratio LC3BII/LC3BI y activaban una autofagia completa<sup>127</sup>. Esta situación podría también producirse con el tratamiento con metformina en células infectadas, de hecho en nuestros estudios la metformina aumenta la cantidad de LC3B I y II en células infectadas y en hepatocitos primarios, pero son necesarios más estudios para conocer si se completa la autofagia.

La autofagia además de ser un proceso para la obtención de nutrientes tiene otras funciones, por ejemplo se activa por la respuesta inmune celular para eliminación de bacterias y virus y, cuando la activación de la autofagia es continua, está implicado en fenómenos de muerte celular llamada "muerte celular programada tipo II"<sup>123</sup>. De hecho, en tejidos y líneas celulares de carcinoma hepatocelular menos agresivos, los niveles de autofagia son más elevados que en aquellas líneas y tejidos más agresivos y recidivantes<sup>128</sup>. En hepatocitos primarios tratados con metformina se ha observado un aumento tanto de los niveles de LC3BII como de caspasa 3, que además se corrobora con otros estudios realizados en melanoma, cáncer de colon y cáncer endometrial<sup>129</sup>. Además, Takahashi y cols. 2014, también observaron que la metformina regulaba la autofagia y la apoptosis, y cómo una inhibición de la autofagia disminuía la rotura de PARP y la activación de las caspasa 3/7 y 9<sup>129</sup>.

Por lo que la disminución en la infección en células tratadas con metformina, así como la disminución de la viabilidad celular, puede estar producido por la activación de la autofagia y por procesos de muerte celular programa tipo II, pero son necesarios más experimentos para demostrar esta hipótesis.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. El virus de la hepatitis C modifica la vía de señalización de la insulina *in vivo* e *in vitro*; tanto por el aumento de la expresión génica de esta vía en células PBMC de pacientes curados del genotipo 1 del virus, como por la inhibición de la proteína PTEN y el aumento de mTOR y TCTP en células de la línea Huh7.5 de carcinoma hepatocelular humano infectadas con el replicón JFH1.
2. El tratamiento con insulina en células infectadas con JFH1 reduce aún más la cantidad de PTEN y AKT, provocando un aumento en la tasa de replicación del virus de la hepatitis C.
3. La metformina promueve la inhibición de mTOR, PTEN, AKT, PTP1B y TCTP en células infectadas por JFH1. Asimismo, la metformina inhibe el ciclo replicativo del virus de la hepatitis C, al disminuir la replicación viral, la proteína core, la producción de virus en el medio de cultivo y la TCDI<sub>50</sub> del medio resultante.
4. La simvastatina inhibe la proliferación celular *in vitro*, de manera dosis dependiente en líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma inhibiendo la proteína mTOR.
5. El tratamiento con metformina también inhibe la proliferación celular *in vitro*, de manera dosis dependiente en dichas líneas celulares. La metformina además de inhibir mTOR, disminuye los niveles proteicos de PTEN y PTP1B.
6. La combinación de ambos fármacos en la línea celular HepG2 disminuía más la viabilidad celular que cada fármaco por separado, mientras que en la línea Huh7.5 no se observó dicho efecto sinérgico. Sin embargo, en Huh7.5 se inhibían tanto los oncogenes mTOR y TCTP, y se activaba el supresor de tumores PTEN.

7. La combinación de ambos fármacos afecta de manera similar a las células infectadas por JFH1, manteniéndose la inhibición de mTOR y TCTP. El marcador de autofagia LC3B está incrementado por el tratamiento con metformina en células infectadas por JFH1. La proteína Caspasa 3 también aumenta por el tratamiento con metformina en hepatocitos primarios. Al mismo tiempo, existe un efecto sinérgico de la metformina y la simvastatina sobre la inhibición del ciclo replicativo del virus.

# CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

1. Hepatitis C virus modifies the insulin signaling pathway both *in vivo* and *in vitro*; through gene expression up-regulation in PBMC from genotype 1 infected patients, together with the inhibition of PTEN, inducing mTOR and TCTP in Huh7.5 cells infected with JFH1.
2. Insulin treatment in infected cells further reduces PTEN and AKT, inducing the hepatitis C virus replication.
3. Metformin inhibits mTOR, PTEN, AKT, PTP1B and TCTP protein expression on JFH1 infected cells, and inhibits hepatitis C viral replication, core protein, medium viral production and medium TCID<sub>50</sub>.
4. Simvastatin treatment decreases cell proliferation *in vitro* in a dose-dependent manner in human cells by inhibiting mTOR protein.
5. Metformin treatment also inhibits cell proliferation *in vitro* in a dose-dependent manner in both cells. PTEN and PTP1B were found down-regulated by metformin.
6. Simvastatin and metformin combination in HepG2 cells decreases cell viability more than drugs separately, while in Huh7.5 the synergic effect was not observed. However, in Huh7.5 cells, drugs combination inhibits both mTOR and TCTP oncogenes and activates the tumor suppressor PTEN.
7. Simvastatin and metformin co-treatment affects similarly to cells infected with JFH1, inhibiting mTOR and TCTP. LC3B, an autophagy marker, is found increased after metformin treatment in JFH1 infected cells. Caspase 3 increases after metformin treatment in human primary hepatocytes. A synergic effect was observed by drug combination in the viral cycle.





## **BIBLIOGRAFÍA**



---

<sup>1</sup>Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.

<sup>2</sup> Cohen, J. The scientific challenge of Hepatitis C. *Science* 1999, 285:26-30

<sup>3</sup> Sandip KB, Ranjit R. Hepatitis C virus infection and insulin resistance. *World J Diabetes*. 2014 Feb; 5(1): 52–58

<sup>4</sup> Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993 Nov;74 ( Pt 11):2391-9.

<sup>5</sup> Hofmann W, Zeuzem S, Sarrazin C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *Journal of clinical virology* 2005;32(2):86

<sup>6</sup> Lee LY, Tong CY, Wong T, Wilkinson M. New therapies for chronic hepatitis C infection: a systematic review of evidence from clinical trials. *Int J Clin Pract*. 2012 Apr;66(4):342-55.

<sup>7</sup> Khaliq S, Khaliq SA, Zahur M, Ijaz B, Jahan S, Ansar M, et al. RNAi as a new therapeutic strategy against HCV. *Biotechnol.Adv*. 2009.

<sup>8</sup> Puyang X, Poulin D, Mathy J, Anderson L, Ma S, Fang Z, et al. Mechanism of resistance of hepatitis C virus replicons to structurally distinct cyclophilin inhibitors. *Antimicrob.Agents Chemother*. 2010;54(5):1981-1987.

<sup>9</sup> Gutiérrez JA, Lawitz EJ, Poordad F. Interferon-free, direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2015 Jun 17.

<sup>10</sup> Documento del II Consenso español sobre tratamiento de la hepatitis C. Sociedad española para el estudio del hígado. 2015

- 
- <sup>11</sup> Tang H, Gris H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin.Sci.* 2009;117(2):49.
- <sup>12</sup> Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol.* 1992 Mar;66(3):1476-83
- <sup>13</sup> Spångberg K, Wiklund L, Schwartz S. Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *J Gen Virol.* 2001 Jan;82(Pt 1):113-20
- <sup>14</sup> Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.* 2012 Feb 14;3:54.
- <sup>15</sup> Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol.* 2007 May 7;13(17):2406-15.
- <sup>16</sup> Premkumar A, Wilson L, Ewart GD, Gage PW. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett.* 2004 Jan 16; 557(1-3):99-103.
- <sup>17</sup> J. Schulze zur Wiesch, H. Schmitz, E. Borowski, P. Borowski The proteins of the Hepatitis C virus: Their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. *Archives of Virology* June 2003, Volume 148, Issue 7, pp 1247-1267
- <sup>18</sup> Bermúdez Aguirre, AJ. Función de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis. *Revista de educación bioquímica* 2008.
- <sup>19</sup> Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F, Moradpour D Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat.* 2011 May; 18(5):305-15.
- <sup>20</sup> Hundt J, Li Z, Liu Q. Post-translational modifications of hepatitis C viral proteins and their biological significance. *World J Gastroenterol.* 2013 Dec 21;19(47):8929-39.

- 
- <sup>21</sup> Choi M, Lee S, Choi T, Lee C. A hepatitis C virus NS4B inhibitor suppresses viral genome replication by disrupting NS4B's dimerization/multimerization as well as its interaction with NS5A. *Virus Genes*. 2013;47:395–407.
- <sup>22</sup> Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J Virol*. 2004 Oct;78(20):11288-95.
- <sup>23</sup> Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of Hepatitis C virion production via phosphorylation of NS5A. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000032
- <sup>24</sup> Moradpour D, Penin F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:113–142.
- <sup>25</sup> Sharma SD. Hepatitis C virus: molecular biology current therapeutic options. *Indian J Med Res*. 2010;131:17–34
- <sup>26</sup> <https://euhcvdb.ibcp.fr/euHCVdb/>
- <sup>27</sup> Barretto N, Sainz B Jr, Hussain S, Uprichard SL. Determining the involvement and therapeutic implications of host cellular factors in hepatitis C virus cell-to-cell spread. *J Virol*. 2014 May;88(9):5050-61.
- <sup>28</sup> Felmler DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses*. 2013 May 23;5(5):1292-324.
- <sup>29</sup> Zhu YZ, Qian XJ, Zhao P, Qi ZT. How hepatitis C virus invades hepatocytes: the mystery of viral entry. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr 7;20(13):3457-67
- <sup>30</sup> Barth H, Schnober EK, Zhang F, Linhardt RJ, Depla E, Boson B, Cosset FL, Patel AH, Blum HE, Baumert TF. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol*. 2006 Nov;80(21):10579-90

- 
- <sup>31</sup> Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J, Tercé F, Duverlie G, Rouillé Y, Dubuisson J. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology*. 2012 Apr;55(4):998-1007.
- <sup>32</sup> Sharma NR, Mateu G, Dreux M, Grakoui A, Cosset FL, Melikyan GB. Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion. *J Biol Chem*. 2011 Sep 2;286(35):30361-76.
- <sup>33</sup> Brazzoli M, Bianchi A, Filippini S, Weiner A, Zhu Q, Pizza M, Crotta S. CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J Virol*. 2008 Sep;82(17):8316-29.
- <sup>34</sup> Dreux M, Dao Thi VL, Fresquet J, Guérin M, Julia Z, Verney G, Durantel D, Zoulim F, Lavillette D, Cosset FL, Bartosch B. Receptor complementation and mutagenesis reveal SR-BI as an essential HCV entry factor and functionally imply its intra- and extra-cellular domains. *PLoS Pathog*. 2009 Feb;5(2):e1000310
- 35 Kielian M, Rey FA. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Jan;4(1):67-76.
- <sup>36</sup> Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol*. 2011 Mar-Apr;8(2):258-69.
- <sup>37</sup> Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2000 Jul;81(Pt 7):1631-48.
- <sup>38</sup> Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel)*. 2014 Dec 15;3(4):892-921.
- <sup>39</sup> Ploen D, Hafirassou ML, Himmelsbach K, Schille SA, Biniossek ML, Baumert TF, Schuster C, Hildt E. TIP47 is associated with the hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of viral particles. *Eur J Cell Biol*. 2013 Dec;92(12):374-82.

---

<sup>40</sup> Williams KJ. Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *J Clin Invest.* 2008 Oct;118(10):3247-59.

<sup>41</sup> Jo J, Lohmann V, Bartenschlager R, Thimme R. Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2005;86(1):1-11.

<sup>42</sup> Kolykhalov AA, Agapov EV, Blight KJ, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science.* 1997 Jul 25;277(5325):570-4.

<sup>43</sup> Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(12):6478-83.

<sup>44</sup> del Campo JA, López RA, Romero-Gómez M. Insulin resistance and response to antiviral therapy in chronic hepatitis C: mechanisms and management. *Dig Dis.* 2010;28(1):285-93.

<sup>45</sup> Douglas MW, George J. Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2009;15(35):4356-64.

<sup>46</sup> Rui L. Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2014 Jan;4(1):177-97.

<sup>47</sup> G. Sesti, M. Federici, D. Lauro, *et al.* Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 17 (2001), pp. 363–373

<sup>48</sup> Gammeltoft S, Van Obberghen E. Protein kinase activity of the insulin receptor. *Biochem J* 1986;235:1–11.

<sup>49</sup> Rowland AF, Fazakerley DJ, James DE. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic.* 2011 Jun;12(6):672-81

<sup>50</sup> Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascade. *Mol Cell Biochem* 1998 182:31-48

---

<sup>51</sup> Geering B, Cutillas PR, Vanhaesebroeck B. Regulation of class IA PI3Ks: is there a role for monomeric PI3K subunits? *Biochem Soc Trans.* 2007 Apr;35(Pt 2):199-203.

<sup>52</sup> Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 2000 Mar 15;346 Pt 3:561-76

<sup>53</sup> Choi K and Kim YB. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Korean J Intern Med.* 2010 Jun; 25(2): 119–129.

<sup>54</sup> Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 2009 Aug 15;8(16):2502-8.

<sup>55</sup> Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem. J.* (2008) 415 (333–344)

<sup>56</sup> Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002 Dec;13(10):444-51.

<sup>57</sup> Saltiel AR, Pessin JE. Insulin Signaling pathway in time and space. *TRENDS in cell Biology* (2002), 12, 2, 65-71.

<sup>58</sup> Hui J.M, Sud A, Farrell G.C, Bandara P, Byth K, Kench J.G, *et al.* Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C and virus infection fibrosis progression. *Gastroenterology*, 125 (2003), pp. 1695–1704

<sup>59</sup> Romero-Gómez M, Del Mar Vilorio M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, Fernández-Rodríguez CM, Corpas R, Cruz M, Grande L, Vázquez L, Muñoz-De-Rueda P, López-Serrano P, Gila A, Gutiérrez ML, Pérez C, Ruiz-Extremera A, Suárez E, Castillo J. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology.* 2005 Mar;128(3):636-41.

<sup>60</sup> Kahn B.B. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell*, 92 (1998), pp. 593–596



- 
- <sup>61</sup> Kawaguchi Y, Mizuta T. Interaction between hepatitis C virus and metabolic factors. *World J Gastroenterol*. Mar 21, 2014; 20(11): 2888–2901.
- <sup>62</sup> Del Campo JA Manuel Romero-Gómez M. Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: A way out for the virus?. *World J Gastroenterol* 2009 October 28; 15(40): 5014-5019
- <sup>63</sup> Enguita-Germán M, Fortes P. Targeting the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2014 Oct 27;6(10):716-37.
- <sup>64</sup> Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2012 Mar 31;379(9822):1245-55.
- <sup>65</sup> Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, Ayuso C, Castells L, Montañá X, Llovet JM, Bruix J. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol*. 2007 Mar;46(3):474-81. Epub 2006 Nov 29.
- <sup>66</sup> Ashworth RE, Wu J. Mammalian target of rapamycin inhibition in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2014 Nov 27;6(11):776-82.
- <sup>67</sup> Moeini A, Cornellà H, Villanueva A. Emerging signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer*. 2012 Sep;1(2):83-93.
- <sup>68</sup> Mortenson MM, Galante JM, Schlieman MG, Bold RJ. AKT: A novel target in pancreatic cancer therapy. *Cancer Therapy*. 2004; Vol 2, 227-238.
- <sup>69</sup> Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Aug;8(4):393-412
- <sup>70</sup> Finn RS. Current and Future Treatment Strategies for Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: Role of mTOR Inhibition *Liver Cancer*. Nov 2012; 1(3-4): 247–256

- 
- <sup>71</sup> Bhat M, Sonenberg N, and Gores G. The mTOR Pathway in Hepatic Malignancies. *Hepatology*. 2013 August ; 58(2): 810–818
- <sup>72</sup> Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F and Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*. 2010 Jul, 1. 120(7): 2355-2369
- <sup>73</sup> Shaw, R. J. Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005, 310, 1642–1646.
- <sup>74</sup> Duque JE; Lopez C and Cruz N. Antitumor mechanisms of metformin: Signaling, metabolism, immunity and beyond. *Univ. Sci.* [online]. 2010, vol.15, n.2, pp. 122-129.
- <sup>75</sup> Romero-Gómez M, Diago M, Andrade RJ, Calleja JL, Salmerón J, Fernández-Rodríguez CM, Solà R, García-Samaniego J, Herrerías JM, De la Mata M, Moreno-Otero R, Nuñez O, Oliveira A, Durán S, Planas R. Treatment of insulin resistance with metformin in naïve genotype 1 chronic hepatitis C patients receiving peginterferon alfa-2a plus ribavirin. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1702-8.
- <sup>76</sup> EASL LiverTree™. Ampuero J. Apr 12, 2014; 49920
- <sup>77</sup> Tzatsos A, Kandror KV. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2006 Jan;26(1):63-76
- <sup>78</sup> Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2009 July; 89 (3): 1025-1078
- <sup>79</sup> Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W. Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2013 Feb;144(2):323-32.

---

<sup>80</sup> Ampuero J, Romero-Gomez M. Prevention of hepatocellular carcinoma by correction of metabolic abnormalities: Role of statins and metformin. *World Journal of Hepatology*. 2015 May 18; 7(8): 1105-1111.

<sup>81</sup> Cheng J, Huang T, Li Y, Guo Y, Zhu Y, Wang Q, Tan X, Chen W, Zhang Y, Cheng W, Yamamoto T, Jing X, Huang J. AMP-activated protein kinase suppresses the in vitro and in vivo proliferation of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2014 Apr 7;9(4):e93256.

<sup>82</sup> Stossel TP. The discovery of statins. *Cell*. 2008 Sep 19;134(6):903-5.

<sup>83</sup> Relja B, Meder F, Wilhelm K, Henrich D, Marzi I, Lehnert M. Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells. *Int J Mol Med*. 2010 Nov;26(5):735-41

<sup>84</sup> Relja B, Meder F, Wang M, Blaheta R, Henrich D, Marzi I, Lehnert M. Simvastatin modulates the adhesion and growth of hepatocellular carcinoma cells via decrease of integrin expression and ROCK. *Int J Oncol*. 2011 Mar;38(3):879-85.

<sup>85</sup> Butt AA, Yan P, Bonilla H, Abou-Samra AB, Shaikh OS, Simon TG, Chung RT, Rogal SS, ERCHIVES (Electronically Retrieved Cohort of HCV Infected Veterans) study team. Effect of addition of statins to antiviral therapy in HCV infected persons: Results from ERCHIVES. *Hepatology*. 2015 Aug; 62(2):365-74.

<sup>86</sup> Ye J. Reliance of Host Cholesterol Metabolic Pathways for the Life Cycle of Hepatitis C Virus *PLoS Pathog*. 2007 Aug; 3(8): e108

<sup>87</sup> Ferrini JB, Ourlin JC, Pichard L, Fabre G, Maurel P. Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol* 1998; 107: 341-52.

<sup>88</sup> Reed LJ y Muench LH. A simple method for estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg*. 1938, 27: 493-497.

<sup>89</sup> Peta V, Torti C, Milic N, Focà A, Abenavoli L. Adiponectin serum level in chronic hepatitis C infection and therapeutic profile. *World J Hepatol*. 2015 Jan 27;7(1):44-52.

---

<sup>90</sup> Clément S, Peyrou M, Sanchez-Pareja A, Bourgoïn L, Ramadori P, Suter D, Vinciguerra M, Guilloux K, Pascarella S, Rubbia-Brandt L, Negro F, Foti M. Down-regulation of phosphatase and tensin homolog by hepatitis C virus core 3a in hepatocytes triggers the formation of large lipid droplets. *Hepatology*. 2011 Jul;54(1):38-49.

<sup>91</sup> Waris G, Felmlee DJ, Negro F, Siddiqui A. Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *J Virol*. 2007 Aug;81(15):8122-30.

<sup>92</sup> Cheng D, Zhang L, Yang G, Zhao L, Peng F, Tian Y, Xiao X, Chung RT, Gong G. Hepatitis C virus NS5A drives a PTEN-PI3K/Akt feedback loop to support cell survival. *Liver Int*. 2015 Jun;35(6):1682-91.

<sup>93</sup> Gao TT, Qin ZL, Ren H, Zhao P, Qi ZT. Inhibition of IRS-1 by hepatitis C virus infection leads to insulin resistance in a PTEN-dependent manner. *Virol J*. 2015 Feb 3;12:12.

<sup>94</sup> Bayascas JR. Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cell Cycle*. 2008 Oct;7(19):2978-82.

<sup>95</sup> Mannova P, Beretta L. Activation of N-Ras-PI3K-Akt-mTOR pathway by Hepatitis C Virus of Cell Survival and Viral Replication. *Journal of virology*, 2005, 79, 14, 8742-8749

<sup>96</sup> Ashiru O, Howe JD, Butters TD. Nitazoxanide, an antiviral thiazolide, depletes ATP-sensitive intracellularCa<sup>2+</sup> stores. *Virology* 462-463(2014)135–148

<sup>97</sup> Susini L, Besse S, Duflaut D, Lespagnol A, Beekman C, Fiucci G, Atkinson AR, Busso D, Poussin P, Marine JC, Martinou JC, Cavarelli J, Moras D, Amson R and Telerman A. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death and Differentiation* (2008) 15, 1211–1220.

<sup>98</sup> Bommer UA, Heng C, Perrin A, Dash P, Lobov S, Elia A, Clemens MJ. Roles of the translationally controlled tumour protein (TCTP) and the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, in cellular stress responses. *Oncogene*. 2010 Feb 4;29(5):763-73.

- 
- <sup>99</sup> Gale M Jr, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG. Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol*. 1998 Sep;18(9):5208-18.
- <sup>100</sup> Romero-Gómez M. Insulin resistance and hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2006 Nov 28; 12(44): 7075–7080.
- <sup>101</sup> Butler M, McKay RA, Popoff IJ, Gaarde WA, Witchell D, Murray SF, Dean NM, Bhanot S, Monia BP. Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1028-34.
- <sup>102</sup> Gonzalez E, McGraw TE. The AKT kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*. 2009, 15 8(16):2502-2058
- <sup>103</sup> Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C Virus Core Protein Upregulates Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Impairs the Downstream Akt/Protein Kinase B Signaling Pathway for Insulin Resistance. *J Virol*. 2008 March; 82(6): 2606–2612
- <sup>104</sup> Pierotti M A, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, Pisanisi P and Pilotti S. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. *Oncogene* (2013) 32, 1475–1487.
- <sup>105</sup> García-Ruiz I, Solís-Muñoz P, Gómez-Izquierdo E, Muñoz-Yagüe MT, Valverde AM, Solís-Herruzo JA. Protein-tyrosine phosphatases are involved in interferon resistance associated with insulin resistance in HepG2 cells and obese mice. *J Biol Chem*. 2012 Jun 1;287(23):19564-73.
- <sup>106</sup> Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014 Feb 13;7:55-64.

---

<sup>107</sup> Zakikhani M, Blouin MJ, Piura E, Pollak MN. Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Aug;123(1):271-9.

<sup>108</sup> Karnevi E, Said K, Andersson R,<sup>1</sup> and Rosendahl AH. Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer.* 2013; 13: 235.

<sup>109</sup> Harris K, Smith L. Safety and efficacy of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic hepatitis C. *Ann Pharmacother.* 2013 Oct;47(10):1348-52.

<sup>110</sup> Song MS, Salmena L and Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2012 May; 13, 283-296.

<sup>111</sup> Saito T, Chiba T, Yuki K, Zen Y, Oshima M, Koide S, Motoyama T, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Tawada A, Tada M, Kanai F, Takiguchi Y, Iwama A, Yokosuka O. Metformin, a diabetes drug, eliminates tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One.* 2013 Jul 29;8(7)

<sup>112</sup> Morales LD, Casillas Pavón EA, Shin JW, Garcia A, Capetillo M, Kim DJ, Lieman JH. Protein tyrosine phosphatases PTP-1B, SHP-2, and PTEN facilitate Rb/E2F-associated apoptotic signaling. *PLoS One.* 2014 May 8;9(5):e97104.

<sup>113</sup> Zheng LY, Zhou DX, Lu J, Zhang WJ, Zou DJ. Down-regulated expression of the protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is associated with aggressive clinicopathologic features and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Apr 13;420(3):680-4

<sup>114</sup> Liu H, Wu Y, Zhu S, Liang W, Wang Z, Wang Y, Lv T, Yao Y, Yuan D, Song Y. PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2015 Apr 10;359(2):218-25

- 
- <sup>115</sup> Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, Telerman A. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 24;99(23):14976-81.
- <sup>116</sup> Acunzo J, Baylot V, So A, Rocchi P. TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treatment Reviews* Volume 40, Issue 6, July 2014, Pages 760–769
- <sup>117</sup> Fang Z, Tang Y, Fang J, Zhou Z, Xing Z, Guo Z, Guo X, Wang W, Jiao W, Xu Z, Liu Z. Simvastatin inhibits renal cancer cell growth and metastasis via AKT/mTOR, ERK and JAK2/STAT3 pathway. *PLoS One*. 2013 May 17;8(5):e62823.
- <sup>118</sup> Babcook MA, Shukla S, Fu P, Vazquez EJ, Puchowicz MA, Molter JP, Oak CZ, MacLennan GT, Flask CA, Lindner DJ, Parker Y, Daneshgari F, Gupta S. Synergistic simvastatin and metformin combination chemotherapy for osseous metastatic castration-resistant prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 2014 Oct;13(10):2288-302.
- <sup>119</sup> Ding J, Wang H. Multiple interactive factors in hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*. 2014 Apr 28;346(1):17-23.
- <sup>120</sup> Hoshida Y, Fuchs BC, Bardeesy N, Thomas F, Baumert TF, and Chung RT. Pathogenesis and prevention of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2014 Nov; 61(1 0): S79–S90.
- <sup>121</sup> Zhu Q, Li N, Han Q, Zhang P, Yang C, Zeng X, Chen Y, Lv Y, Liu X, Liu Z. Statin therapy improves response to interferon alfa and ribavirin in chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *Antiviral Res*. 2013 Jun;98(3):373-9.
- <sup>122</sup> Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M and Enomoto N. Targeting Lipid Metabolism in the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 197:361–70

---

<sup>123</sup> Yang D, Li L, Liu H, Wu L, Luo Z, Li H, Zheng S, Gao H, Chu Y, Sun Y, Liu J and Jia L. Induction of autophagy and senescence by knockdown of ROC1 E3 ubiquitin ligase to suppress the growth of liver cancer cells *Cell Death and Differentiation* (2013) 20, 235–247;

<sup>124</sup> Ke P-Y and Chen SSL. Autophagy in hepatitis C virus-host interactions: Potential roles and therapeutic targets for liver-associated diseases. *World J Gastroenterol*. 2014 May 21; 20(19): 5773–5793.

<sup>125</sup> Vescovo T, Romagnoli A, Perdomo AB, Corazzari M, Ciccocanti F, Alonzi T, Nardacci R, Ippolito G, Tripodi M, Garcia-Monzon C, Lo Iacono O, Piacentini M, Fimia GM. Autophagy protects cells from HCV-induced defects in lipid metabolism. *Gastroenterology*. 2012 Mar;142(3):644-653.e3.

<sup>126</sup> Sir D, Chen W-L, Choi J, Wakita T, Yen T.S.B, and Ou JJ. Induction of Incomplete Autophagic Response by Hepatitis C Virus via the Unfolded Protein Response *Hepatology*. 2008 October ; 48(4): 1054–1061

<sup>127</sup> Song YM, Lee YH, Kim JW, Ham DS, Kang ES, Cha BS, Lee HC, Lee BW. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy*. 2015;11(1):46-59.

<sup>128</sup> Rautou PE, Mansouri A, Lebrech D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases *Journal of Hepatology* 2010 vol. 53 j 1123–1134

<sup>129</sup> Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, Takebayashi A, Kita N, Takahashi K, Murakami T. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell Int*. 2014 Jun 16;14:53.







---

## **ANEXO I: ARTÍCULOS**



# The Hepatitis C Virus Modulates Insulin Signaling Pathway *In Vitro* Promoting Insulin Resistance

José A. del Campo\*, Marta García-Valdecasas, Lourdes Rojas, Ángela Rojas, Manuel Romero-Gómez

Unit for Medical and Surgical Management of Digestive Diseases and CIBERehd, Valme University Hospital, Sevilla, Spain

## Abstract

Insulin is critical for controlling energy functions including glucose and lipid metabolism. Insulin resistance seems to interact with hepatitis C promoting fibrosis progression and impairing sustained virological response to peginterferon and ribavirin. The main aim was to elucidate the direct effect of hepatitis C virus (HCV) infection on insulin signaling both *in vitro* analyzing gene expression and protein abundance. Huh7.5 cells and JFH-1 viral particles were used for *in vitro* studies. Experiments were conducted by triplicate in control cells and infected cells. Genes and proteins involved in insulin signaling pathway were modified by HCV infection. Moreover, metformin treatment increased gene expression of PI3K, IRS1, MAP3K, AKT and PTEN more than >1.5 fold. PTP1B, encoding a tyrosin phosphatase, was found highly induced (>3 fold) in infected cells treated with metformin. However, PTP1B protein expression was reduced in metformin treated cells after JFH1 infection. Other proteins related to insulin pathway like Akt, PTEN and phosphorylated MTOR were also found down-regulated. Viral replication was inhibited *in vitro* by metformin. A strong effect of HCV infection on insulin pathway-related gene and protein expression was found *in vitro*. These results could lead to the identification of new therapeutic targets in HCV infection and its co-morbidities.

**Citation:** del Campo JA, García-Valdecasas M, Rojas L, Rojas Á, Romero-Gómez M (2012) The Hepatitis C Virus Modulates Insulin Signaling Pathway *In Vitro* Promoting Insulin Resistance. PLoS ONE 7(10): e47904. doi:10.1371/journal.pone.0047904

**Editor:** Eliane F. Meurs, Institut Pasteur, France

**Received:** May 16, 2012; **Accepted:** September 17, 2012; **Published:** October 25, 2012

**Copyright:** © 2012 del Campo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grant P110/0611 from Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Economy. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: joseantonio.delcampo@gmail.com

## Introduction

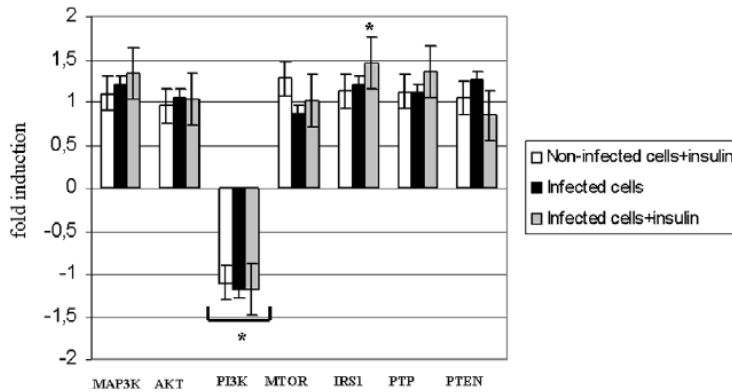
Some metabolic disorders including obesity, steatosis and insulin resistance are known to play a major role in the response to peginterferon/ribavirin and fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C [1,2]. Molecular, pathological, epidemiological, randomized controlled trials and observational studies have highlighted the relationship between hepatitis C virus and glucose metabolism [3,4]. However, the effect of adding insulin sensitizers (like metformin or pioglitazone) to peginterferon plus ribavirin remain controversial [5,6]. There is growing evidence that metabolic perturbations associated with HCV infection may result from interactions between viral and host proteins [7,8]. The insulin receptor belongs to a subfamily of receptor tyrosine kinases that includes the IGF (Insulin-like Growth Factor) receptor and the IRR (Insulin Receptor-Related Receptor) [9]. Insulin has diverse effects on cells including stimulation of glucose transport, gene expression and alterations of cell morphology. These effects utilize different signaling pathways: i) adaptor molecules such the IRS (Insulin Receptor Substrates), the SHC (Src and Collagen Homologues) and the GRB2 (Growth Factor Receptor Binding protein-2), ii) lipid kinases such as PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), iii) small G-proteins like Rac, and iv) serine, threonine and tyrosine kinases [10]. Proteins involved in insulin signaling display binding sites for numerous signaling partners from Akt inhibiting apoptosis by phosphorylating the BAD (BCL2 Antagonist of Cell Death) component of the BAD/BCLXL complex [11] or activating mTOR (Mammalian Target of Rapamycin)/FRAP pathway to protein tyrosine phosphatase (PTPase) [12]

(Protein Tyrosine Phosphatases) that catalyzes the dephosphorylation of insulin receptor and its substrates, leading to attenuation of insulin action.

PTP1B has been shown to function as the insulin receptor phosphatase [13]. Insulin stimulates cell growth and differentiation, and promotes the storage of substrates in fat, liver and muscle by stimulating lipogenesis, glycogen and protein synthesis, and inhibiting lipolysis, glycogenolysis and protein breakdown. Insulin resistance or deficiency results in profound dysregulation of these processes, and produces elevations in fasting and postprandial glucose and lipid levels.

Metformin improves insulin sensitivity, inhibits hepatic gluconeogenesis and decreases glycogenolysis. It is an activator of AMP-activated protein kinase (AMPK) signalling, [14,15] and reduces mTOR pathway. Metformin also inhibits cancer cell growth by inducing cell cycle arrest and enhancing apoptosis [16]. A controlled, randomized, double-blind clinical trial (TRIC-1) examined the effect of adding metformin to standard therapy in the treatment of hepatitis C [4]. This study demonstrated that women infected with hepatitis C virus genotype 1 and HOMA >2 treated with metformin showed a greater drop in viral load during the first 12 weeks and a doubled sustained viral response in comparison with females receiving placebo. Recently, García-Ruiz et al. [17] have demonstrated that inhibition of PTP1B using pervanadate restores insulin and interferon response. These authors have found that metformin is able to reduce PTP activity.

We aim to analyze *in vitro* the effect of HCV infection on insulin signaling pathway elements involving gene and protein



**Figure 1. Insulin effect on gene expression in vitro.** Relative gene expression (fold induction [+]) and fold inhibition [-] in Huh7.5 cells grown in the presence of insulin (10 nM) and JFH-1 particles (one particle per cell). Experiments were performed in triplicate. Control experiment (non-infected cells and no insulin added) was used as a reference (fold induction = 1). (\*) =  $p < 0.05$ . doi:10.1371/journal.pone.0047904.g001

expression. This aim was partially achieved by the identification of key elements involved in HCV-related insulin resistance response (like PTP1B). Interestingly, metformin was found to inhibit viral replication in vitro.

**Materials and Methods**

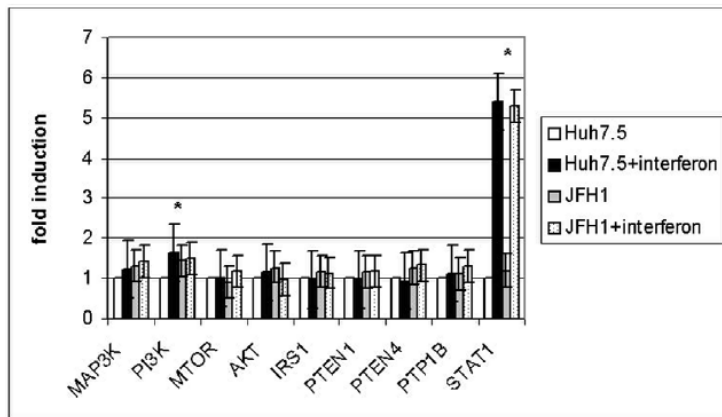
**Cell Culture and Gene Expression Assays**

Huh7.5 cells (Apath LLC, New York, USA) were grown in DMEM culture medium supplemented with 10%FBS, antibiotics, L-Glutamine and Non-Essential aminoacids. Cells were incubated at 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Cell culture-derived virus particles JFH-1, were generated as previously described [18]. Infective particles of JFH-1 were added to growing cells at 1 particle/cell rate. In general, infective particles were added 24 hours after cell seeding, incubated together with the cells for 48 hours. Then, cultured media was removed and fresh virus-free media was added to cell cultures and incubated for additional 48 hours. Total RNA was

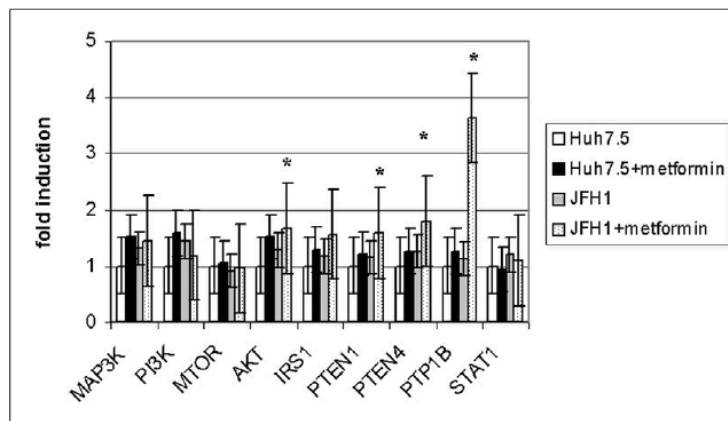
extracted from cellular lysates using standard protocols. We have performed the respective retro-transcription reactions using commercially available kits (Qiagen, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Gene expression was analyzed by semi-quantitative real-time PCR using a Stratagene model MX3005P cyclor. Insulin (10 nM) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), metformin (2 mM) purchased from Acofarma (Barcelona, Spain) and  $\alpha$ -interferon (500 IU/ml) purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) were added to culture media when indicated.

**JFH-1 Replication Analysis**

Primers sequences used for JFH1 replication were: fwd-CTGTGAGGAAGACTACTGTCT and reverse: CGCCCTAT-CAGGCAGTACCA. All experiments involving JFH-1 infective particles have been performed in triplicate in a P3 laboratory. The presence of JFH-1 RNA in cell cultures was determined by RT-PCR using specific primers.



**Figure 2. Interferon effect on insulin pathway gene expression.** Huh7.5 cultures were treated with 500 IU/ml and infected with JFH-1 particles. Experiments were performed in triplicate. Control experiment (non-infected cells and no insulin added) was used as a reference (fold induction = 1). (\*) =  $p < 0.05$ . doi:10.1371/journal.pone.0047904.g002



**Figure 3. PTP1B is highly induced in the presence of metformin and HCV.** Gene expression (fold induction) of insulin pathway-related genes in Huh7.5 cells treated with metformin (2 mM) was analyzed. Experiments were performed in triplicate. (\*) =  $p < 0.05$ . doi:10.1371/journal.pone.0047904.g003

#### Protein Analysis

Cells were disrupted using a commercial kit for protein extraction (Qiagen, Hilden, Germany) and proteins were quantified using Bradford method. For western-blot analysis, total protein (40  $\mu$ g) were loaded onto 10–12% SDS-PAGE. Primary antibodies (IRS1, IRS1-P, IRS1-P S612, IRS1-P S636/639, mTOR, mTOR-P S2448, MTOR-P S2481, PTEN-1, PTP1B, and  $\beta$ -ACTIN (for loading control) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).

#### Statistical Analysis

Continuous variables were summarized as means  $\pm$  SD and categorical variables as frequency and percentage. Comparisons between groups were made by using the Student t test or the Mann-Whitney U test for continuous variables and the  $[\chi^2]$  test or Fisher exact probability test for categorical data. Two-sided P values  $< 0.05$  were considered statistically significant. Data were collected in a computerized database and analyzed using the SPSS package (SPSS 18.0 for Windows, Chicago, IL).

### Results

#### Insulin Signaling-related Gene Expression in vitro

Figure 1 shows relative gene expression (relative fold induction) in the presence or absence of insulin (10 nM) in both control and infected cells. Significant differences were found for IRS1 fold induction ( $1.5 \pm 0.23$ ) and PI3K fold inhibition ( $-1.2 \pm 0.3$ ) ( $p < 0.05$ ). Since all anti-HCV therapies are based on  $\alpha$ -interferon, we further investigate the role of this molecule in insulin pathway-gene expression (Figure 2). As expected, interferon treatment promoted STAT1 gene expression induction ( $> 5$  fold). PI3K gene expression was also significantly induced in the presence of interferon. Other genes related to the insulin signaling pathway were not found to be altered in their expression pattern (Figure 2).

#### Metformin Modifies Insulin-related Gene Expression

We previously shown that adding metformin to peginterferon and ribavirin was safe and improved insulin sensitivity in chronic hepatitis C patients [4]. To further investigate the mechanism

involved in this process, Huh7.5 cells were grown in the presence of metformin and its effect on gene expression was analyzed. Results are shown on Figure 3. Most of the genes involved in insulin pathway (PI3K, IRS1, MAP3K, AKT, PTEN and PTP1B) are induced in the presence of metformin. AKT, PTEN and PTP1B were induced higher than 1.5-fold ( $p < 0.05$ ). This effect is particularly evident in the presence of JFH-1 particles. PTP1B, encoding a tyrosin phosphatase which plays an important role in insulin signaling, is highly induced in the presence of metformin and HCV.

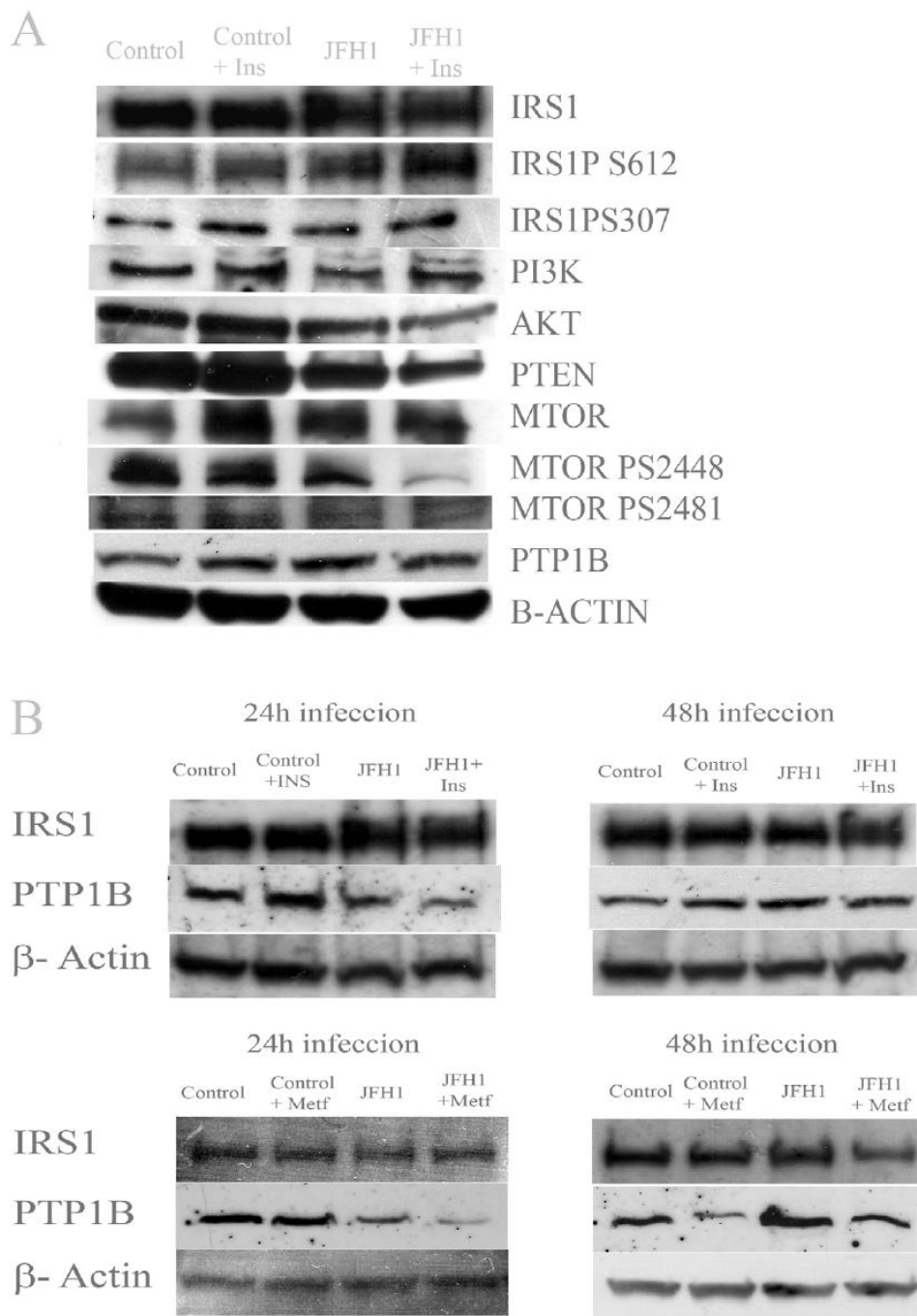
#### Protein Expression in Huh7.5 Cells

Total protein extracts were obtained from Huh7.5 cells treated with insulin and infected with JFH-1 particles and protein abundance was analyzed by immunoblot. Results are shown on Figure 4A and 4B. Major changes in protein expression were observed in AKT, PTEN and phosphorylated MTOR PS2448. These proteins were found down-regulated in the presence of JFH-1 particles and insulin. A representative western-blot is shown on Figure 4. All experiments were performed in triplicate, JFH1 particles were added to Huh7.5 cell cultures and incubated for 48 h. PTP1B protein was found down-regulated after 24 hours of infection (Fig. 4B) when cells were treated either with insulin or metformin. However, this effect was not observed after 48 hours of infection. IRS1 protein was reduced after 48 hours of infection in the presence of metformin.

#### Metformin Inhibits Viral Replication in vitro

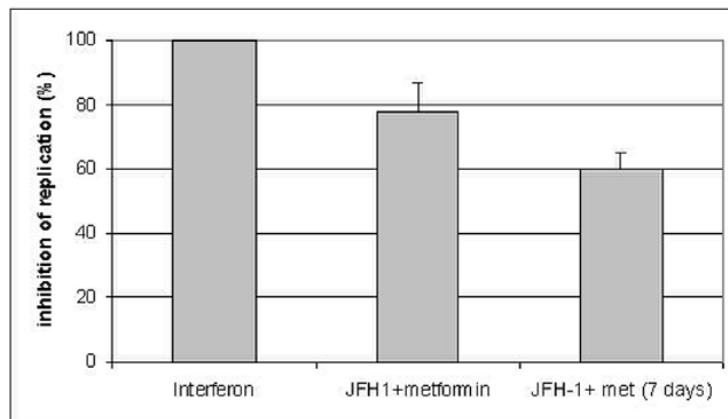
Since metformin affects gene and protein expression in Huh7.5 cells, we wonder if this compound could exert any effect on viral replication. JFH-1 RNA was determined in total RNA extracted from Huh7.5 cells in the presence of metformin (2 mM) compared to cells grown with  $\alpha$ -interferon (500 IU/ml). Results (Figure 5) shown that metformin could inhibit significantly viral replication ( $\sim 80\%$ ) compared to interferon (100%) ( $p < 0.05$ ). These experiments were performed in our usual conditions (see Methods for details). When cells were incubated for longer periods (after one week) viral replication was inhibited by 60% (Figure 5).





**Figure 4. Insulin pathway proteins are down-regulated by JFH1.** **A:** Western blot from Huh7.5 cells in the presence or absence of insulin (20 nM) and infected or not with JFH-1 particles. 40  $\mu$ grams of total protein were loaded per lane. A representative gel is shown for each protein. All experiments were performed in triplicate.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. **B:** IRS1 and PTP1B abundance at 24 and 48 hours post-infection. Huh7.5 cells were infected with JFH1 particles and incubated at the indicated time. Performance of western-blot was as indicated for panel **A**. doi:10.1371/journal.pone.0047904.g004





**Figure 5. Metformin (2 mM) inhibits viral replication in vitro.** Huh7.5 cells treated with interferon (500 IU/ml) were used as a positive control for inhibition of viral replication (100%). Cells were infected with JFH1 and treated with metformin for 48 hours and 7 days. Metformin significantly inhibited viral replication ( $p < 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0047904.g005

## Discussion

In this work, it has been demonstrated that HCV interacts in vitro, with insulin pathway affecting gene expression in vitro and in vivo through different mechanisms: it modifies insulin pathway-related gene and protein expression in Huh7.5 cells in response to treatment (insulin,  $\alpha$ -interferon and metformin). On the other hand, metformin inhibited viral replication in vitro, where PTP1B seems to play an essential role.

These results are also specially relevant for PI3K gene since the presence of metformin in the media enhances this effect not only for PI3K but also for IRS1, MAP3K, AKT and PTEN. PI3K activates AKT and this serine/threonine kinase phosphorylates FoxO1. It is well established that this transcription factor mediates the expression of genes involved in both glucose and lipid metabolism [19–22].

Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) plays important roles in down-regulation of insulin and leptin signaling and is an established therapeutic target for diabetes and obesity [17,23]. PTP1B is regulated by reactive oxygen species (ROS) produced in response to various stimuli, including insulin. It has been shown that PTP1B inhibitor improves insulin resistance and lipid abnormalities in vitro and in vivo [24]. We have shown that PTP1B protein is reduced 24 hours post-infection in cells treated with insulin and metformin (see Fig. 4B). Down-regulation of this protein could explain the reduction of IRS1 in the presence of metformin. This effect on total IRS1 is not observed in the presence of insulin, but phosphorylated IRS1 protein (S612) is increased after 48 hours post-infection (Fig. 4A). PTP1B has a unique role in modulating the signaling of IRS1 and IRS2 in the regulation of hepatic metabolic pathways and represents a rational target for the development of new pharmacological agents aimed at improving hepatic insulin sensitivity [25]. Metformin treatment of infected cells promoted a strong effect on gene expression (PI3K, IRS1, MAP3K, AKT, PTEN) (Figure 3). These genes involved in the insulin signaling pathway were found to be significantly induced, and this effect was particularly relevant for PTP1B. This fact corroborates the role of this protein in the outcome of HCV-dependent insulin resistance. Recently, García-Ruiz et al. [17] have shown that inhibition of PTP-1B activity with

pervanadate and metformin or knocking down PTP-1B reestablishes IFN $\alpha$  response in vitro. Likewise, metformin decreases PTP-1B activity and improves response to IFN $\alpha$  in insulin-resistant obese mice. Moreover, our results indicate that metformin inhibited about 80% JFH-1 replication in Huh7.5 cells when compared to interferon- $\alpha$  treatment, supporting the idea that promoting insulin resistance in HCV infection is highly relevant for viral replication [26]. This effect could be explained by the fact that metformin is an AMPK activator [27] and this protein inhibits mTOR. In this case, mTOR activity should be relevant for viral replication.

mTOR is an evolutionarily conserved serine/threonine protein kinase, and it functions as a central signaling molecule involved in a wide array of cellular processes, such as cell survival, proliferation, and metabolism. Peng et al. [28] have shown that HCV-encoded viral protein up-regulates the mTOR pathway to block apoptosis and imply that NS5A may contribute not only to HCV persistence but also to the development of HCV-related diseases. Protein analysis in this work show that mTOR abundance in Huh7.5 cells is lower in the presence of JFH-1 and insulin (Fig. 4), indicating an interaction between this protein and HCV proteins. On the other hand, mitogen-activated protein kinase (MAP3K) is up-regulated in adipose tissue of obese mice and patients and correlated with TNF- $\alpha$  expression [29], but according to our knowledge, there is no previous report on HCV infection or insulin resistance involving MAP3K.

Clément et al. [30] showed that the core protein of HCV genotype 3a (but not 1b) induced a 50% decrease in the PTEN protein expression level in Huh-7 and HepG2 cells. They concluded that HCV core 3a modulates PTEN expression indirectly because no physical interactions of core 3a and PTEN were detected. The expression of PTEN in Huh7.5 cells infected with JFH1 did not change significantly (Figure 1) but the abundance of protein in infected cells was lower compared to uninfected cells. This effect was enhanced in the presence of insulin (Fig. 4A). A possible explanation would be the occurrence of post-transcriptional regulation events. Metformin improves insulin resistance through AMPK activation. However, when Huh7.5 cells are infected, PTEN (an insulin pathway inhibitor) gene expression is induced in the presence of metformin (Fig. 3).

This fact is probably due to an interaction with viral proteins, promoting enhanced insulin resistance.

Taking all these evidences together we can conclude that HCV interacts with insulin signaling pathway through different mechanisms: it changes the expression of key genes in insulin metabolism (PI3K, PTEN, MAP3K and PTP1B). On the other hand, HCV modulates protein expression in vitro through down-regulation of PTP1B, PTEN and MTOR and when metformin is used, the viral replication is inhibited as shown on Fig. 5. These

results could lead to the identification of new host related therapeutic targets (like PTP1B) in HCV infection.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JADC MR-G. Performed the experiments: MG-V AR LR. Analyzed the data: JADC MR-G MG-V AR LR. Wrote the paper: JADC MR-G.

### References

- Bressler BL, Guindi M, Tomlinson G, Heathcote J (2003) High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology* 38: 639–44.
- Poynard T, Ratzin V, McHutchison J, Manns M, Goodman Z, et al. (2003) Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C. *Hepatology* 38: 75–85.
- Romero-Gómez M, Del Mar Vitoria M, Andrade RJ, Salmerón J, Diago M, et al. (2005). Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 128: 636–641.
- Romero-Gómez M, Diago M, Andrade RJ, Calleja JL, Salmerón J, et al. (2009). Treatment of insulin resistance with metformin in naive genotype 1 chronic hepatitis C patients receiving peginterferon alfa-2a plus ribavirin. *Hepatology* 50: 1702–8.
- Chojkier M, Elkhatay H, Sabry D, Donohue M, Buck M (2012) Pioglitazone decreases hepatitis C viral load in overweight, treatment naive, genotype 4 infected-patients: a pilot study. *PLoS One* 7: e31516.
- Harrison SA, Hamzeh FM, Han J, Pandya PK, Sheikh MY, et al. (2012) Chronic hepatitis c genotype 1 patients with insulin resistance treated with pioglitazone and peginterferon alfa-2a plus ribavirin. *Hepatology* doi:10.1002/hep.25661.
- Pazienza V, Clément S, Pugnale P, Conzelmann S, Forti M, et al. (2007) The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology* 45: 1164–1171.
- Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M, Meyer K, Ray RB, et al. (2008) Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *J Virol* 82: 2606–2612.
- White MF (2003) Insulin signaling in health and disease. *Science* 302: 1710–1711.
- Ogawa W, Matozaki T, Kasuga M (1998) Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signalling. *Mol Cell Biochem* 182: 13–22.
- Machado-Neto JA, Favaro P, Lazarini M, Costa FF, Olalla Saad ST, et al. (2011) Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1404–11.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 21–35.
- Haque A, Andersen JN, Salmeen A, Barford D, Tonks NK (2011) Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity. *Cell* 147: 185–98.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, et al. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167–74.
- Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M (2006) Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 66: 10269–73.
- Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N (2007) Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res* 67: 10804–12.
- García-Ruiz I, Solís-Muñoz P, Gómez-Izquierdo E, Muñoz-Yagüe MT, Valverde AM, et al. (2012) Protein-tyrosine Phosphatases Are Involved in Interferon Resistance Associated with Insulin Resistance in HepG2 Cells and Obese Mice. *J Biol Chem* 287(23): 19564–73.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, et al. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309: 623–6.
- Altomonte J, Richter A, Harbaran S, Suriawinata J, Nakae J, et al. (2003) Inhibition of FoxO1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E718–28.
- Matsumoto M, Han S, Kitamura T, Accili D (2006) Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 116: 2464–2472.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, et al. (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 423: 550–555.
- Samuel VT, Choi CS, Phillips TG, Romanelli AJ, Geisler JG, et al. (2006) Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes* 55: 2042–2050.
- Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, et al. (2002) Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2: 497–503.
- Ma YM, Tao RY, Liu Q, Li J, Tian JY, et al. (2011) PTP1B inhibitor improves both insulin resistance and lipid abnormalities in vivo and in vitro. *Mol Cell Biochem* 357: 65–72.
- González-Rodríguez A, Mas Gutiérrez JA, Sanz-González S, Ros M, Burks DJ, et al. (2010) Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice. *Diabetes* 59: 588–99.
- Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K (2011) Inhibition of hepatitis C virus replication through adenosine monophosphate-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Microbiol Immunol.* 55: 774–82.
- Shi WY, Xiao D, Wang L, Dong LH, Yan ZX, et al. (2012) Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis* 3: e275. doi: 10.1038/cddis.2012.13.
- Peng L, Liang D, Tong W, Li J, Yuan Z (2010) Hepatitis C virus NS5A activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, contributing to cell survival by disrupting the interaction between FK506-binding protein 38 (FKBP38) and mTOR. *J Biol Chem* 285: 20870–81.
- Jager J, Grémeaux T, Gonzalez T, Bonnafous S, Debard C, et al. (2010) Tpl2 kinase is upregulated in adipose tissue in obesity and may mediate interleukin-1beta and tumor necrosis factor- $\alpha$  effects on extracellular signal-regulated kinase activation and lipolysis. *Diabetes* 59: 61–70.
- Clément S, Peyrou M, Sanchez-Pareja A, Bourgoin L, Ramadori P, et al. (2011) Down-regulation of phosphatase and tensin homolog by hepatitis C virus core 3a in hepatocytes triggers the formation of large lipid droplets. *Hepatology* 54: 38–49.

## Hepatitis C virus infection alters lipid metabolism depending on IL28B polymorphism and viral genotype and modulates gene expression *in vivo* and *in vitro*

Á. Rojas,<sup>1\*</sup> J. A. del Campo,<sup>1\*</sup> M. Maraver,<sup>1</sup> R. Aparcero,<sup>1</sup> M. García-Valdecasas,<sup>1</sup>

M. Diago,<sup>2</sup> I. Carmona,<sup>3</sup> R. J. Andrade,<sup>4</sup> R. Solà<sup>5</sup> and M. Romero-Gómez<sup>1</sup> <sup>1</sup>UCM Digestive Diseases and CIBERehd Hospital de Valme, Sevilla, Spain; <sup>2</sup>Hospital General de Valencia, Valencia, Spain; <sup>3</sup>Hospital Virgen Macarena, Sevilla, Spain; <sup>4</sup>Hospital Virgen de la Victoria and CIBERehd, Málaga, Spain; and <sup>5</sup>Hospital del Mar, Barcelona, Spain

Received June 2013; accepted for publication October 2013

**SUMMARY.** Hepatitis C virus (HCV) interacts with lipid receptors to enter the cell, circulates as lipovirion particle and is secreted as VLDL. We aimed to investigate the role of the rs12979860 polymorphism in the IL28B gene in 143 with chronic hepatitis C genotype 1, 144 infected with genotype 3, 90 genotype 4 and 413 noninfected individuals on lipid profile and to test the impact of HCV infection in an *in vitro* model on VLDL biosynthesis-related gene expression. rs12979860 polymorphism was analysed using real-time PCR coupled to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Huh7.5 (rs12979860 CT) and Huh7 (genotype CC) cells were infected with JFH-1 particles and serum from patients infected with genotypes 1 and 3. Gene expression of apolipoprotein B (apoB), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), acetyl CoA carboxylase (ACC), diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2), diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) and low-density lipoprotein receptor (LDLR) genes were determined by semi-quantitative RT-PCR *in vivo* and *in vitro*. Genotype CC

rs12979860 polymorphism was associated with significantly higher serum LDL and total cholesterol levels in patients with hepatitis C genotype 1 but not in patients with hepatitis C genotype 3, genotype 4 and control (non-infected) population. Genotype CC was more often seen in genotype 3 and healthy people in comparison with genotype 1;  $P = 0.001$ . *In vitro* results showed that HCV infection promotes lipid metabolism gene expression induction depending on viral genotype, but to a lesser extent in cells with CT genotype. These results demonstrate that IL28B genotype influences lipid metabolism in patients with hepatitis C but not in noninfected and it seems to be viral genotype-mediated. HCV infection modifies lipid-related genes expression (DGAT1 and DGAT2) in cultured cells based on viral genotype and IL28 polymorphism.

**Keywords:** cholesterol, HCV, IFN therapy, LDL, sustained viral response.

### INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) infection is characterized by a high rate of progression to fibrosis, chronic hepatitis, leading to cirrhosis and ultimately to hepatocellular carcinoma. Hepatocyte steatosis, defined as accumulation of fat droplets in hepatocytes, is a histological feature of a group of liver diseases including not only metabolic disorders or alcohol con-

sumption but also chronic hepatitis C and drug-induced liver disease [1,2]. Metabolic and viral steatosis has been associated with viral genotypes. Patients with genotype 3 showed fat accumulation in absence of metabolic disorders and steatosis correlates with viral replication levels in serum and liver and disappears after successful antiviral therapy [3]. *In vitro* models have corroborated the association phenotype-viral genotype seen *in vivo* and the role of PPAR $\gamma$  expression on triglyceride accumulation in Huh7 cells transfected with genotypes 1b and 3a core proteins has been demonstrated [4]. Lipoproteins regulate the mechanism of viral entry into hepatocytes, viral replication and secretion. Moreover, HCV circulates combined with lipoproteins in the serum, possibly obscuring the virus from the host immune response, which may in turn help in viral entry into the hepatocyte [5]. LDLr is a membrane glycoprotein that controls the primary pathway through which cholesterol enters the cells. The

**Abbreviations:** ACC, acetyl CoA carboxylase; FASN, fatty acid synthase; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HCV, hepatitis C virus; SVR, sustained viral response.

**Correspondence:** José A. del Campo, PhD, Unit for the Clinical Management of Digestive Diseases and CIBERehd, Hospital Universitario de Valme, Universidad de Sevilla, B-41014 Sevilla, Spain.

E-mail: joseantonio.delcampo@gsma4.com

\*These authors contributed equally to this work.

© 2013 John Wiley & Sons Ltd

physiological ligand LDL, contains a single copy of apolipoprotein B-100 and carries 65–70% of plasma cholesterol. The receptor also binds apolipoprotein E-containing lipoproteins such as very low-density lipoproteins ( $\beta$ -VLDL). However, the lipid metabolic pathways that are active in HCV-infected liver in humans are not fully understood.

Ge et al [6] identified a key role for genetic variation in the IL28B gene region on chromosome 19 for predicting response to pegylated interferon and ribavirin therapy in patients chronically infected with genotype 1 HCV infection. This finding has been confirmed in other independent cohorts [7–10]. The interaction between IL28B and lipid metabolism has been reported in genotype 1 and associated with SVR rate and fibrosis progression [11]. We sought to investigate the interaction between rs12979860 polymorphism in the IL28B gene and lipid profile in patients with chronic hepatitis C across viral genotypes 1, 2, 3 and 4 and also the impact of HCV infection on cell-culture-based model on lipid metabolism.

## PATIENTS AND METHODS

We have analysed the IL28B rs12979860 polymorphism in a Spanish cohort: 143 chronic hepatitis C genotype 1, 144 patients infected with HCV genotype 3, 90 patients infected with genotype 4 and 413 noninfected controls. This population comprises nonrelated Caucasian men ( $n = 228$ ; 55.2%) and women ( $n = 185$ , 44.8%). Informed consent in writing was obtained from all patients, and the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and approved by the Valme University Hospital ethical committee. The age of this population ranged between 34 and 68 years (mean age  $48 \pm 9$  years). We divided them into three genotype groups (CC, CT and TT) according to the rs12979860 SNP, and then, we analysed the genotype effect on treatment outcome, lipid profile and laboratory measurements using conventional statistical analyses. Cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, HDL-cholesterol and triglyceride levels were analysed with Hitachi protocol in the routine laboratory. For IL28B polymorphism gene analysis we have used real-time PCR coupled to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).

## Genotyping

DNA from patients and controls was extracted from peripheral blood using standard methods. Genotyping of the rs12979860 was performed using a TaqMan 5' allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers used were 5' GCCTGTCGGTACT-GAACCA 3' (forward) and 5' GCGGGAGTGC AATTCAAC 3' (reverse), and the TaqMan MGB probe sequences were 5' TGGTTGGGGCCTTC 3' and 5' CTGGTTCACGGCTTC 3'. The probes were labelled with the fluorescent dyes VIC and FAM, respectively. PCRs were carried out in a total volume

of 8  $\mu$ L with the following amplification protocol: denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 92 °C for 15 s and finished with annealing and extension at 60 °C for 1 min. Genotyping of each sample was automatically attributed by the SDS 1.3 software for allelic discrimination.

## Cell culture and HCV replication

Huh7.5 (rs12979860 genotype CT) and Huh7 (rs12979860 genotype CC) cells were grown in DMEM culture medium supplemented with 10% FBS, antibiotics, L-glutamine and nonessential aminoacids. Cells were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Infective particles of JFH-1 were added to growing cells at one particle/cell rate. Total RNA was extracted from cellular lysates using standard protocols. We have performed the respective reverse-transcription polymerase-chain reaction using commercially available kits (Qiagen, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Gene expression was analysed by semiquantitative real-time PCR using a Stratagene model MX3005P cyclor. Oligonucleotides were obtained from Qiagen (Quantitect Primer Assay) for amplification of the following genes: apolipoprotein B (apoB), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), fatty acid synthase (FASN), acetyl CoA carboxylase (ACC), diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2), diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) and low-density lipoprotein receptor (LDLR) and GAPDH as housekeeping gene. Cells were treated with interferon  $\alpha$  (Sigma, St. Louis, MO, USA). All experiments involving JFH-1 replicon have been performed in triplicate in a P3 laboratory. The presence of JFH-1 RNA in cell cultures was determined by RT-PCR using specific primers. Cultured cells were also infected using serum from HCV patients infected with genotypes 1 and 3 with high viral load ( $>7 \log$  IU/mL).

## Gene expression analysis

Total RNA was extracted from cellular lysates using standard protocols. We have performed the respective reverse-transcription polymerase-chain reaction using commercially available kits (Qiagen, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Gene expression was analysed by semiquantitative real-time PCR using a Illumina<sup>®</sup> Eco<sup>™</sup> cyclor. Primers for ACC, APOB, DGAT1, DGAT2, FASN, LDLr, MTP, PPAR $\alpha$ , SREBP genes were obtained from Qiagen (Hilden, Germany).

## Statistical analysis

Genotypic frequencies were obtained by direct counting, and statistical analysis was performed by the chi-square test calculated on  $2 \times 2$  contingency tables assuming a recessive model (CC, CT and TT) using the Statistic program (Epi Info, version 6.0; Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Odd ratio (OR) with 95%



confidence intervals (95%CI) was calculated using the same programme. Median values of quantitative variables were compared using a nonparametric test (Mann-Whitney two-tailed test or Kruskal-Wallis). The *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### IL28B polymorphism is associated with serum LDL and total cholesterol in a genotype-dependent manner

Figure 1 showed that rs12979860CC genotype was associated with higher serum LDL levels in patients with chronic hepatitis C genotype 1 (*n* = 143): serum LDL concentrations were CC = 116 ± 36 mg/dL; CT = 101 ± 28 mg/dL; TT = 85 ± 35 mg/dL, (*P* = 0.013). However, no differences were seen in HDL-cholesterol: CC = 51 ± 13 mg/dL, CT = 53 ± 15 mg/dL, TT = 58 ± 18 mg/dL; *P* = 0.08. These associations were not found in patients with hepatitis C genotype 3 LDL-cholesterol level (CC = 110 ± 40 mg/dL, CT = 91 ± 31 mg/dL, TT = 115 ± 41 mg/dL; *P* = 0.14) neither in patients infected with genotype 4 (*n* = 90): serum LDL: CC = 105 ± 58 mg/dL, CT = 95 ± 28 mg/dL, TT = 99 ± 17 (*P* = 0.39); total cholesterol: CC = 179 ± 40 mg/dL, CT = 175 ± 31 mg/dL, TT = 180 ± 38 mg/dL (*P* = *ns*) (data not shown). Lastly, no differences were seen in the control group (*n* = 413): LDL-cholesterol: CC = 130 ± 29 mg/dL; CT = 130 ± 25 mg/dL; TT = 136 ± 26 mg/dL; *P* = 0.3 (Fig. 1d).

### Impact of viral load, fibrosis and interleukin 28b polymorphisms on sustained virological response

Viral load and fibrosis stage are well-known predictors for sustained viral response (SVR) in chronic Hepatitis C

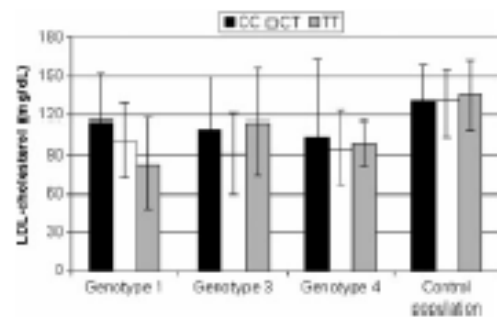


Fig. 1 LDL-cholesterol plasma levels in patients with chronic hepatitis C according to the rs12979860 polymorphism and viral genotype. Significant differences were found in genotype 1 infection only (*P* < 0.05). Data were adjusted by age, sex, viral load, weight and height. Control population (*n* = 413) was also analysed.

outcome. The relationship of these two variables with IL28B genotype was also investigated. Viral load was not associated to IL28B polymorphism (CC = 5.95 ± 0.66 log IU/mL vs CT + TT = 5.99 ± 0.76 log IU/mL, *P* = *ns*). Moreover, fibrosis stage was not associated with IL28B SNP yet. The prevalence of genotype CC was 29.8% in F0-F1, 40.7% in F2 and 35.7% in F3-F4; *P* = *ns*.

Genotype CC of the IL28b polymorphism was strongly associated with sustained virological response: genotype CC: 108/134 (80.6%); genotype CT: 72/132 (54.5%) and genotype TT: 20/38 (52.6%); *P* = 0.0001.

Univariate analysis including age, gender, viral load, viral genotype, total cholesterol, triglycerides, glucose, body mass index and fibrosis on SVR showed that genotype, fibrosis and glucose levels were associated with SVR together with interleukin 28b genotypes that were strongly related to virological response. Multivariate analysis (Binary Logistic Regression) demonstrated HCV genotype 1 (O.R.: 0.51; 95%CI: 0.37-0.7); *P* = 0.0001 and IL28b genotype CC (O.R.: 2.35; 95%CI: 1.5-3.7); *P* = 0.0001, were found independently associated with SVR.

Moreover, CC genotype was more often seen in hepatitis C genotype 3 (54.1%) and noninfected people (51.3%) than genotype 1 (33.1%); *P* = 0.0001 for both comparisons.

### Lipid metabolism gene expression in vivo

To further investigate the effect of viral infection on lipid metabolism, RNA levels of several genes related to lipid metabolism using *in vivo* and *in vitro* approaches were studied. A group of patients (*n* = 17) infected with HCV genotype 1 were classified as responders-RC (*n* = 8) and nonresponders-NR (*n* = 9) to standard treatment (INF + ribavirin). Blood samples were collected after written consent, and PBMC cells were isolated for total RNA extraction. The expression of several genes was analysed, and results shown that DGAT1 and DGAT2 genes were induced (1.5- and 1.6-fold, respectively) in NR individuals compared with RC patients (Fig. 2). On the other hand, IDLr gene was found to be induced (2.5 fold) in RC patient compared with NR.

### Lipid metabolism gene expression in vitro

Huh7.5 (IL28B rs12979860 CT genotype) and Huh7 (IL28B rs12979860 CC genotype) cells were infected by JFH-1 full-length genomic replicon (genotype 2a) and human serum from patients infected by HCV genotypes 1, 2 and 3 (viral load >10<sup>7</sup> IU/mL). Cell infection was assessed by RT-PCR. Results show that most of the genes studied were found upregulated in Huh7.5 infected cells (see Fig. 3), especially for ACC-genotype 3 (2.2-fold induction). DGAT1 and DGAT2 were induced upon HCV infection (JFH1, genotype 1 and genotype 2; 1.5- to 1.7-fold induction). MTP was induced by JFH1 and genotype 3 infection (1.5- to 1.7-fold induction). APOB was found

downregulated, especially for genotype 3 infection (0.5-fold induction). When Huh7 (genotype CC) cells were infected (see Fig. 3), DGAT2 and MTP were found highly induced

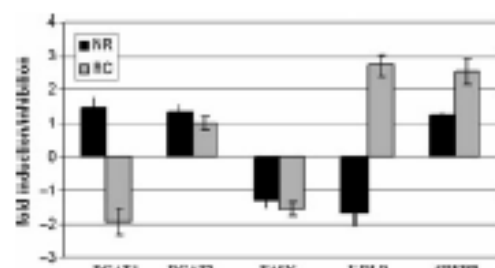


Fig. 2 Gene expression (fold induction) of DGAT1, DGAT2, FASN, LDLR and SREBP1 in PBMC from nonresponders (NR) HCV patients vs responders (RC). Experiments were performed in triplicate.

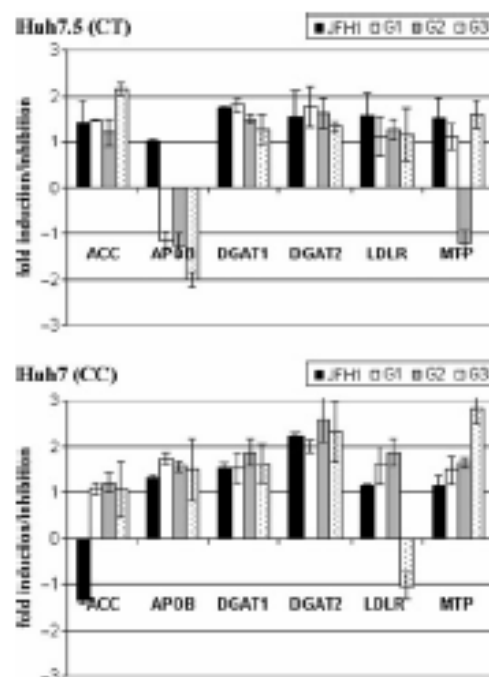


Fig. 3 Gene expression (fold induction/inhibition) in Huh7.5 (IL28B CT genotype) and Huh7 (IL28B CC genotype) cells infected by JFH1, genotypes 1 and 3 HCV. Lipid metabolism-related gene expression was analysed by semiquantitative real-time PCR (see methods for details). Cell infection was assessed by RT-PCR. Data shown are mean values from three independent experiments.

in genotype 3 (2.3- to 2.8-fold induction). APOB and DGAT1 were also induced (1.5- to 1.7-fold induction), but to a lesser extent than DGAT2.

## DISCUSSION

A relationship between IL28B polymorphism and lipid profile in patients with hepatitis C genotype 1 has been demonstrated, and this association was not present in patients with hepatitis C genotype 3 or 4 and in the noninfected control group. The rs12979860 polymorphism lies in a region between two IFN-lambda genes, IL28A and IL28B, harbouring multiple highly correlated gene variants. The causal genetic variant underlying the observed genetic associations at this locus is not known yet, but there is evidence enough for rs12979860 to be a strong predictor of hepatitis C treatment response. Administration of the exogenous interferons alpha, beta and gamma in the setting of treatment for chronic HCV infection and other conditions has been shown to lower LDL-cholesterol and raise triglyceride levels in very low-density lipoproteins, concomitant with suppression of lipoprotein lipase [12,13]. The effect of IFN-lambda on serum lipids has not been explored, although it is believed that IFN-lambda stimulate an IFN signalling gene response through a common pathway with type 1 IFNs [14]. Loss of function of interferon lambda-4 seems to be associated with protection against HCV infection [15]. Li et al. [16] have shown an association between rs12979860 genotype and host serum lipid levels, suggesting a relationship between endogenous IFN response and lipids. They hypothesize that the IFN-lambda rs12979860 CC responder genotype, which was associated with both increased likelihood of treatment response and higher LDL-cholesterol levels in the studied cohort, is associated with lower IFN-lambda activity or lower intrahepatic IFN signalling gene expression. We found that LDL and total cholesterol levels were higher in patients infected with HCV genotypes 1 and 4 harbouring the favourable (CC) genotype for IL28B gene. These results suggest that observed associations are directly related to hepatitis C virus-host interactions instead of a direct effect of this locus on lipid metabolism. Genotype CC of IL28B was more often seen in genotype 3 and noninfected patients than in genotypes 1 and 4 [17]. At least in part, this host factor could select virus infection and promote chronic infection or spontaneous clearance according to viral genotype and lipid metabolism interplay. Approximately 30% of individuals spontaneously clear acute HCV infection. Host genetic variation is assumed to explain the heterogeneity in HCV clearance across individuals. Variation in genes involved in the immune response has already been linked to outcome of acute HCV infection, [18] presumably owing to alteration in the strength and quality of the immune response. The association of HCV with lipoproteins appears to have a precise biological significance: HCV uptake by hepatocytes

is mediated, among other proteins, by the low-density lipoprotein (LDL) receptor [19]. The direct relationship between LDL and SVR may partially be explained by competition for LDL receptor sites preventing viral entry into hepatocytes, increasing exposure of HCV to the host immune response in the serum. These findings suggest that serum lipids may yield some prognostic value in determining the probability of treatment success and possibly highlight new therapeutic targets, as pointed out by Berg *et al.* [20], in a *post hoc* analysis of the phase III REALIZE study.

To test the hypothesis about the interaction of lipid metabolism and HCV infection gene expression has been analysed *in vivo* and *in vitro*. Gene expression in PBMC from patients infected with HCV genotype 1 showed that *LDLR* and *FASN* were downregulated (60% and 30%, respectively) in nonresponders compared with RC. *In vitro* results have shown that all genes studied related to VLDL biosynthesis were found induced in infected cells especially for *ACC*, *DGAT1* and *DGAT2*. These results agree with others previously reported, [21] but some important issues such as viral and cell genotypes should be kept in mind when analysing these results. Moreover, patients bearing favourable IL28B genotype (CC) show increased serum LDL (Fig. 1). This result correlates with induced *LDLR* gene expression found both, *in vivo* and *in vitro* (Figs 2 & 3). APOB was found upregulated in CC cells and downregulated in CT cells after genotypes 1 and 3 infection (Fig. 3). Recently, Aizawa *et al.* [22] have ruled out that serum apoB-100 concentration might be an informative marker for changes in HCV-associated intracellular lipoprotein metabolism in patients carrying the IL28B rs8099917 polymorphism (TT) genotype.

Downregulation of gene expression found *in vivo* can be explained based on the different (extra hepatic) compartments studied. Through a proteomic approach, Mancone *et al.* [23] have recently shown that lipoprotein assembly is affected by the presence of viral particles both *in vivo* and *in vitro*. Their results indicate a HCV-associated LDL-specific reduction in apoA-I in cellular models, providing a robust correlation between the virus and the LDL altered composition. Treatment trials investigating statins (targeting lipid metabolism) and fibrates to improve virological response have yielded mixed results [24,25]. Recently, Georgescu *et al.* [26] in a randomized trial analysed the

Impact of adding 20 mg/d of Fluvastatin or placebo to peginterferon plus ribavirin on sustained virological response in a cohort of 209 chronic hepatitis C genotype 1 patients irrespective of baseline lipid profile. Fluvastatin increased sustained response rate in comparison with placebo (66/104 (63%) vs 52/105 (50%);  $P = 0.05$ ). These data agreed results from an open-label randomized study in Japan reporting 21% increase in SVR rate in patients receiving fluvastatin [27]. As documented in the Virahep-C cohort [28], insulin resistance may also contribute to the relationship between serum lipids and SVR. The effect of insulin resistance on SVR has been previously reported, [29] confirmed in meta-analysis [30] approach and independently from IL28B associated with SVR [31]. Insulin resistance, fibrosis and genotype were independent predictors of the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon plus ribavirin. Patients with hepatitis C and hypercholesterolaemia, thus candidates for statins use and with higher likelihood of bearing genotype CC, could reach better-sustained response not due to statins use but favourable genetic background. A randomized placebo-controlled trial could demonstrate the final role of statins in the management of hepatitis C.

In conclusion, we found a significant association between IL28B polymorphism and serum lipid metabolism in HCV genotype-1 infected patients but not in genotypes 3 and 4. Results showed in this work corroborate finding regarding the relationship between LDL and total cholesterol levels in patients infected by HCV genotype 1 with favourable IL28B polymorphism. *In vivo* experiments have shown a reduced *LDLR* gene expression in the presence of HCV. *In vitro*, cells with favourable (CC) IL28B polymorphism showed induced expression of genes associated with lipid metabolism but in a lower manner than cells bearing CT genotype.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Grant Support: PI10/611 from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and PI09/448 from Consejería de Salud Andalusian Government. We thank Drs Pawlotzky and Bensadoun for kindly providing Huh7 (genotype CC) cells.

#### REFERENCES

- Negro F, Sarreal AJ. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data. *Liver Int* 2009; 29: 26–37.
- Kiike K. Steatosis, liver injury, and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection. *J Gastroenterol* 2009; 44: 82–88.
- Del Campo JA, Romero-Gómez M. Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: a way out for the virus? *World J Gastroenterol* 2009; 15: 8014–8019.
- de Gottardi A, Pizzetta V, Pugnali P, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and - $\gamma$  mRNA levels are reduced in chronic hepatitis C with steatosis and genotype 3 infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 107–114.
- André P, Berlemster G, Budkowska A, Bréchet C, Lotteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 93–104.



- 6 Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399–401.
- 7 Suppiah V, Moldovan M, Allenstead G, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100–1104.
- 8 Tamaki Y, Nishida N, Sugiyama M, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105–1109.
- 9 Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 1338–1345.
- 10 McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 2010; 138: 2307–2314.
- 11 Fabris C, Falletti E, Gasotthi A, et al. The interleukin 28B rs12979860 C/T polymorphism and serum cholesterol as predictors of fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and persistently normal transaminases. *J Med Virol* 1997; 84: 747–755.
- 12 Shinohara E, Yamashita S, Kihara S, et al. Interferon alpha induces disorder of lipid metabolism by lowering postheparin lipases and cholesteryl ester transfer protein activities in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1502–1506.
- 13 Andrade RJ, Garcia-Escano ME, Valdiviaño P, et al. Effects of interferon-beta on plasma lipid and lipoprotein composition and postheparin lipase activities in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 929–935.
- 14 Ank N, West H, Pakudis SR. IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J Interferon Cytokine Res* 2006; 26: 373–379.
- 15 Booth D, George J. Loss of function of the new interferon IFN- $\lambda$  may confer protection from hepatitis C. *Nat Genet* 2013; 45: 119–120.
- 16 Li JH, Luo XQ, Tillmann HL, et al. Interferon-lambda genotype and low serum low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2010; 51: 1904–1911.
- 17 El Awady MC, Baker H, Din NG, et al. IL28B polymorphism and cytomegalovirus predict response to treatment in Egyptian HCV type 4 patients. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 290–298.
- 18 Thio CL. Host genetic factors and antiviral immune responses to hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 713–726.
- 19 Popescu CI, Duboisson J. Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biol Cell* 2009; 102: 63–74.
- 20 Berg T, Andreone P, Ivis. Predictors of virological response with Telaprevir-based combination treatment in HCV genotype 1-infected patients with prior peginterferon/ribavirin treatment failure: post-hoc analysis of the phase III REALIZE study. *Hepatology* 2011; 54(Suppl): 375A.
- 21 Fujino T, Nakamura M, Yada R, et al. Expression profile of lipid metabolism-associated genes in hepatitis C virus-infected human liver. *Hepatol Res* 2010; 40: 923–929.
- 22 Aizawa Y, Yoshizawa K, Aida Y, Ishiguro H, Abe H, Tsubota A. Genotype rs8099917 near the IL28B gene and amino acid substitution at position 70 in the core region of the hepatitis C virus are determinants of serum apolipoprotein B-100 concentration in chronic hepatitis C. *Mol Cell Biochem* 2012; 360: 9–14.
- 23 Mancose C, Stindler C, Sestangolo L, et al. Hepatitis C virus production requires apolipoprotein A-I and affects its association with nascent low-density lipoproteins. *Gut* 2011; 60: 378–386.
- 24 Badier T, Fauti J, Madhoum M, et al. Fluvastatin inhibits hepatitis C replication in humans. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1383–1389.
- 25 O'Leary JG, Chou JL, McMahon CM, Chung RT. Atorvastatin does not exhibit antiviral activity against HCV at conventional doses: a pilot clinical trial. *Hepatology* 2007; 45: 895–898.
- 26 Georgescu EF, Steba L, Teodorescu R. Potential Enhancement of both early and sustained virological response by fluvastatin in chronic hepatitis C treated with standard peginterferon/ribavirin therapy. A pilot study. *J Hepatol* 2011; 54: 85.
- 27 Kondo C, Atsukawa M, Tsubota A, et al. An open-label randomized controlled study of pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with versus without fluvastatin. *J Virol Hepat* 2012; 19: 615–622.
- 28 Conjovcanam HS, Waked AS, Allhal N, et al. Changes in insulin sensitivity and body weight during and after peginterferon and ribavirin therapy for hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140: 469–477.
- 29 Romero-Gómez M, Del Mar Vitoria M, Andrade RJ, et al. Insulin resistance impacts sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; 128: 636–641.
- 30 Bilien M, Aparcero R, Kawaguchi T, et al. Meta-analytic insulin resistance and sustained virological response in hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 297–305.
- 31 Del Campo JA, Ampuero J, Rojas L, et al. Insulin resistance predicts sustained virological response to treatment of chronic hepatitis C independently of the IL28B rs12979860 polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 74–80.





ORIGINAL ARTICLE

## Fine-mapping butyrophilin family genes revealed several polymorphisms influencing viral genotype selection in hepatitis C infection

J Ampuero<sup>1,2</sup>, JA del Campo<sup>1,2,3</sup>, L Rojas<sup>1,2,3</sup>, RJ García-Lozano<sup>2</sup>, M But<sup>4</sup>, R Solís<sup>4</sup>, X Forns<sup>5</sup>, R Moreno-Otero<sup>6</sup>, R Andrade<sup>7</sup>, M Diago<sup>8</sup>, J Salmerón<sup>9</sup>, L Rodrigo<sup>10</sup>, JA Pons<sup>11</sup>, JM Navarro<sup>12</sup>, JL Calleja<sup>13</sup>, J García-Samaniego<sup>14</sup>, M García-Vádecasas<sup>1</sup>, A Rojas<sup>2</sup>, R Millán<sup>1</sup>, MF González-Escribano<sup>2</sup> and M Romero-Gómez<sup>1</sup>

Host-viral genetic interaction has a key role in hepatitis C infection (HCV) and maybe in the viral selection. In a preliminary GWAS analysis, we identified BTN3A2 rs9104 to be associated with HCV genotype 1. Therefore, our aim was to determine the influence of BTN family on the selection of HCV genotype. We performed a fine-mapping analysis of BTN gene region in a cohort of chronic HCV infection ( $N=841$ ), validating significant results in another independent chronic HCV infection cohort ( $N=637$ ), according to selection of viral genotype. BTN3A2 rs9104, BTN3A2 rs793528, BTN2A1 rs6929846, BTN2A1 rs7763910 and BTN3A3 rs13220495 were associated with viral genotype selection. Interestingly, BTN3A2 rs9104 GG genotype was closely related to genotype 1 infection (80.7% (394/488) compared with genotype 3 infection (53.5% (23/43);  $P=0.0001$ ) in patients harboring IL28B-CT/TT genotype, although this effect was not observed in IL28B-CC genotype. Similarly, BTN3A3 rs13220495 CC genotype was linked to genotype 3 infection (100% (32/32) compared to genotype 1 (87.3% (137/157);  $P=0.028$ ) in patients harboring IL28B-CC genotype, but did not in IL28B-CT/TT genotype. Genetic variants in the butyrophilin family genes may alter susceptibility to infection, selecting HCV genotype and influencing disease progression. BTN3A2 rs9104 was strongly associated with genotype 1 infection and the haplotype BTN3A3 rs13220495 CC + IL28B genotype CC was universal in patients with hepatitis C genotype 3a.

Genes and Immunity (2015) 16, 297–300; doi:10.1038/gene.2015.14; published online 30 April 2015

### INTRODUCTION

Most individuals with hepatitis C virus (HCV) infection failed to clear the virus and developed chronic hepatitis C with a risk of progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Spontaneous clearance of the virus (SCV) occurred in 15–40% of patients with acute infection depending on gender, interleukin (IL)-28B genotype and HCV genotype.<sup>1</sup> Some data suggested a minor clone of the donor's HCV is transmitted during infection. This clone needs to adapt to the new host and in some circumstances could be responsible for antiviral sensitivity, spontaneous clearance or disease progression.<sup>2</sup> Host and viral factors seem to be implicated on this selection in HCV infection. Host immune responses, both innate<sup>3</sup> and adaptive<sup>4</sup> together with factors regulating HCV entry into the cell and viral quasispecies, have been explored.<sup>5</sup> GWAS studies identified a single-nucleotide polymorphism (SNP) cluster in the IL28B gene with a major effect on HCV clearance.<sup>6</sup> However, the authors failed to demonstrate differences between infected and noninfected patients. Last, IL28B CC genotype was more often seen in patients with hepatitis C genotype 3 than genotype 1, supporting the hypothesis that

genetic background could influence on viral selection in acute infection and also the possibility of achieving SCV. Genetic variants of genes coding proteins involved on entry of the virus have been selected as candidate genes like LDLr (Low-density lipoprotein receptor), CLDN1 (Claudin-1), OCLN (Occludin), NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1), EGFR (Epidermal growth factor receptor) and CD81 (cluster of differentiation 81).<sup>7</sup> In a previous analysis, we identified BTN3A2 (rs9104) to be associated with the selection of viral genotype.<sup>8</sup> However, no definite conclusions have been reached and hypothesis free approaches continued. To explore HCV susceptibility, we aimed to determine the influence of butyrophilin (BTN) family on the selection of HCV genotype.

### RESULTS

Twenty-one SNPs encompassing the BTN gene family were analyzed. The overall cohort enrolled 841 patients, 89.1% (749/841) with HCV genotype 1 and 10.9% (92/841) with HCV genotype 3. The univariate analysis confirmed that BTN3A2 (rs9104) GG genotype was more frequently associated with

<sup>1</sup>Unit for the Clinical Management of Digestive Disease and CIBERhd, Valme University Hospital, Sevilla, Spain; <sup>2</sup>Immunology Unit, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; <sup>3</sup>Hepatology Unit, Hospital Vall d'Hebron and CIBERhd, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Digestive Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; <sup>5</sup>Liver Unit and IDIBAPS, Hospital Clinic and CIBERhd, Barcelona, Spain; <sup>6</sup>Digestive Department, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain; <sup>7</sup>Gastroenterology Department, Hospital Virgen de la Victoria and CIBERhd, Málaga, Spain; <sup>8</sup>Digestive Department, Hospital General de Valencia, Valencia, Spain; <sup>9</sup>Digestive Department, Hospital Universitario San Cecilio and CIBERhd, Granada, Spain; <sup>10</sup>Gastroenterology Department, Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain; <sup>11</sup>Gastroenterology Department, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain; <sup>12</sup>Gastroenterology Department, Hospital Costa del Sol, Marbella, Spain; <sup>13</sup>Liver Unit, Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain and <sup>14</sup>Hepatology Unit, Hospital Carlos III & CIBERhd, Madrid, Spain. Correspondence: Professor M Romero-Gómez, Unit for the Clinical Management of Digestive Diseases and CIBERhd, Valme University Hospital, Avenida de Bellavista s/n, Sevilla 41014, Spain. Email: mromerogomez@ucv.es

<sup>15</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 26 January 2015; revised 20 February 2015; accepted 23 February 2015; published online 30 April 2015

genotype 1 infection, as well as BTN3A2 (rs733528) CC genotype and BTN2A1 (rs6929846) CC genotype, whereas BTN2A1 (rs7763910) GG genotype and BTN3A3 (rs13220495) CC genotype were more frequently observed in genotype 3 infection (Table 1). Later, we stratified these results by IL28B genotype. In this cohort, IL28B CC genotype was associated with HCV genotype 3 (49.5% (45/91) vs 29.1% (214/735);  $P=0.0001$ ). BTN2A2 (rs9104) GG genotype was closely related to genotype 1 infection (80.7% (394/488) compared with genotype 3 infection (53.5% (23/43);  $P=0.0001$ ) in patients harboring IL28B-CT/TT genotype. However, this effect was not observed in IL28B-CC genotype as BTN2A2 GG genotype was present in 75.8% (150/198) HCV genotype 1 and in 77.3% (34/44) in HCV genotype 3 ( $P=0.831$ ; Table 2a). On the other hand, BTN3A3 (rs13220495) CC genotype was linked to genotype 3 infection (100% (32/32)) compared with genotype 1 (87.3% (137/157);  $P=0.028$ ) in patients harboring IL28B-CC genotype. Nevertheless, this association was not observed in IL28B-CT/TT genotype, as BTN3A3 CC genotype was present in 89.1% (336/377) in HCV genotype 1 and in 98.9% (81/33) in HCV genotype 3 ( $P=0.557$ ; Table 2b).

**Validation of BTN3A2**

In the validation cohort, we found BTN3A2 rs9104 GG genotype more common among patients with HCV genotype 1 infection (78.7%) than among patients infected with genotype 3 (65.9%) ( $P<0.005$ ). However, we did not find statistically significant differences in BTN2A2 GG genotype distribution between 1a and 1b viral subtypes (79.7 vs 78.5%;  $P=0.640$ ). On the other hand, IL28B CC genotype was also more prevalent in HCV genotype 3 than genotype 1 (51 vs 32%;  $P<0.0001$ ). Adjusting by sex,

multivariate analysis confirmed that BTN2A2 (rs9104) GG genotype [O.R. 1.72 (95% CI 1.08–2.78);  $P=0.022$ ], IL28B CC genotype [O.R. 0.61 (95% CI 0.42–0.90);  $P=0.012$ ] and age [O.R. 1.05 (95% CI: 1.02–1.08);  $P=0.0001$ ] were independently related to HCV genotype 1 infection.

**BTN2A2 and spontaneous viral clearance**

BTN2A2 GG genotype (rs9104) was not related to spontaneous viral clearance, as it was present in 84.6% in the SVC-cohort vs 83% in healthy controls and 77.6% in chronic hepatitis C cohort.

**DISCUSSION**

Genotype GG of the SNP rs9104 in the BTN gene BTN2A2 was associated with HCV genotype 1 infection. BTN3A2 rs9104 was obtained in a previous GWAS and in this study was largely validated in different cohorts, even performing a fine-mapped study. Bekker et al.<sup>9</sup> conducted a 'whole genome association study' to examine whether CLDN1 genetic variants were associated with the risk of HCV infection or with viral clearance, concluding that genetic variants in regulatory regions of CLDN1 may alter susceptibility to HCV infection. The human BTN family belongs to the immunoglobulin superfamily of transmembrane proteins. The seven BTNs have been loosely grouped into three classes (BTN, BTN2 and BTN3) and BTN-like members. The BTN1 subfamily is composed solely of BTN1A1, whereas the BTN2 subfamily contains three highly homologous members (BTN2A1, BTN2A2 and BTN2A3), as does the BTN3 subfamily (BTN3A1, BTN3A2 and BTN3A3). The gene resides in the juxta-telomeric region of the major histocompatibility class 1 locus on

**Table 1.** Butyrophilin gene family analysis in HCV genotype 1-infected patients vs. HCV genotype 3

SNP	GEN	Genotype 1	Genotype 3	P-value
GG-rs9104	BTN2A2	78.9% (50/637)	65.90% (58/88)	0.006
CC-rs733528	BTN3A2	7.90% (50/634)	1.30% (1/78)	0.033
CC-rs6929846	BTN2A1	62.30% (377/605)	50.70% (37/73)	0.056
CC-rs13220495	BTN3A3	88.80% (464/523)	97.00% (64/66)	0.050
GG-rs7763910	BTN2A1	32.40% (214/661)	43.00% (37/86)	0.049

Abbreviation: SNP, single-nucleotide polymorphism.

**Table 2a.** Influence of the interaction between IL28B and BTN2A2 (rs9104) and BTN3A3 (rs13220495) genotypes, respectively, on the selection of viral genotype

	BTN2A2 rs9104	HCV genotype 1	HCV genotype 3	
IL28B CC genotype	GG	75.8% (150/198)	77.3% (34/44)	$P=0.831$
	AA/AG	24.2% (48/198)	22.7% (10/44)	
IL28B CT/TT genotype	GG	80.7% (394/488)	53.5% (23/43)	$P=0.0001$
	AA/AG	19.3% (94/488)	46.5% (20/43)	

**Table 2b.** Influence of the interaction between IL28B and BTN2A2 (rs9104) and BTN3A3 (rs13220495) genotypes, respectively on the selection of viral genotype

	BTN3A2 rs13220495	HCV genotype 1	HCV genotype 3	
IL28B CC genotype	CC	87.3% (137/157)	100% (32/32)	$P=0.028$
	AC/AA	12.7% (20/157)	0% (0/32)	
IL28B CT/TT genotype	CC	89.1% (336/377)	93.9% (31/33)	$P=0.557$
	AC/AA	10.9% (81/377)	6.1% (2/33)	



chromosome 6.<sup>10</sup> The full-length protein encoded by this gene is a type I membrane protein. While the definite role of this gene remains unknown yet, Le Page et al.<sup>11</sup> suggested that BTN3A2 expression by epithelial cells may modulate the intratumoral infiltration of immune cells. Besides its role in tumor infiltration, HLA genomic region analysis in chromosome 6 has shown relationship between individual genomic variability, exposure to infectious agents and schizophrenia risk.<sup>12</sup> On the other hand, this gene could have a relevant role selecting HCV infection according to genotypes, additionally to IL28B. In fact, combination of IL28B-CT/TT and BTN3A2 rs9104 GG genotype was able to be associated with HCV genotype 1, whereas a combination between IL28B-CC and BTN3A3 rs13220495 CC genotype was related to HCV genotype 3 in 100% of patients. Regarding to this, role of IL28B has been observed in different studies to influence on viral genotype selection.<sup>13</sup> Therefore, genetic factors, like IL28B and BTN3A2 and BTN3A3, could be implicated on genotype selection influencing susceptibility to HCV infection.

The mechanisms influencing the process of hepatitis C transmission and infection include selection of a few clones from the overall quasispecies circulating in the host. The interaction host-virus resulted on clone selection, immune response modulation and induction/inhibition of proteins involved in the viral entry into the hepatocyte. This is probably a key issue in genotype 3 infection, which has become the most difficult to treat.<sup>14</sup> Recent insights into how HCV regulates innate immune signaling within the liver reveal a complex interaction of patient genetic background with viral and host factors of innate immune triggering and control that impacts the outcome of HCV infection and immunity.<sup>15</sup> During an acute infection, natural killer (NK) cells are responsible to kill infected hepatocytes but this ability has been proposed to be controlled by host genetic factors. Genes encoding the inhibitory NK cell receptor KIR2DL3 and its human leukocyte antigen C group 1 ligand directly influenced on the resolution of HCV infection.<sup>16</sup> In chronic hepatitis C, the number of NK cells declines and, additionally, remaining cells become defective to clear infected cells.<sup>17</sup> BTN3A is expressed on most immune cells, and also on some cancer cell lines.<sup>18</sup> Specifically, BTN3A1 is mainly expressed by T lymphocytes, while BTN3A2 is mostly expressed by NK cells. Interestingly, BTN3A2 has the ability to influence negatively on NK cells when is engaged with NKp30, probably decreasing the IFN- $\gamma$  production (via NKp30) when BTN3A2 is stimulated (BTN3A1 stimulation increases IFN- $\gamma$  production).<sup>19</sup>

In conclusion, we have identified a novel host genetic factor involved in HCV infection according to viral genotype, BTN family. This gene encodes a protein related to immune response and could have a relevant role by selecting HCV infection depending on the interaction with IL28B genotype.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design and patients

All patients included in this study were Caucasian and recruited from 14 different Spanish hospitals. The inclusion and exclusion criteria were: 18–70 years of age; persistent positive antibodies to HCV; HCV-RNA positive; and no co-infection with HIV or hepatitis B virus. All patients provided written informed consent for the liver biopsy and genetic testing. The study was approved by each Hospital Center Ethics Committee and was conducted in accordance with the provisions of the declaration of Helsinki and good Clinical Practice Guidelines.

The study design was based on the following steps: (a) samples used for previous GWAS analysis to identify putative signals associated with susceptibility HCV infection ( $n=155$  patients with HCV genotype 1;  $n=801$  healthy controls) (most significant SNP associated with viral genotype infection can be found in Supplementary Table 1); (b) a fine-mapped cohort with chronic hepatitis C patients ( $N=841$ ) to perform a fine-mapping study of BTN family to assess whether some polymorphism of this gene was associated with an increased susceptibility for specific virus genotype infection; (c) a validation cohort with chronic hepatitis

C patients ( $N=637$ ) to confirm results found in fine-mapped cohort according to viral genotype selection; (d) a SCV-cohort with patients showing spontaneous viral clearance ( $N=70$ ), to check the role of BTN on achieving SVC; (e) a control cohort ( $N=169$ ) to validate the allelic and genotype distribution of BTN family. Clinical and demographic characteristics from overall cohorts are shown on Table 1.

The starting material was peripheral blood for all donor samples. DNA was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's recommendations and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The quality of DNA was determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE 19810 USA). DNA samples had a 260/280 ratio between 1.63 and 2.30.

### Genetic analysis

The primary cohort was genotyped for ~260 000 SNPs using the 250 K Nimble array from Affymetrix. The association analysis with susceptibility to HCV genotype 1 infection was investigated using an additive genetic model. The most significant SNPs from the previous GWAS analysis were typed in the two chronic hepatitis C cohorts using 5' nuclease assay with a TaqMan MGB probe in an ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The software employed was SDS 1.3 for allelic discrimination. The fine mapping of the chromosome 6 region encompassing the BTN gene family covers approximately 1.50 kb base pairs including five BTN genes (Figure 1). For the selection of genetic markers, we used data from the International HapMap Project on Caucasian population ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) and Haploview software. On the basis of pair wise linkage disequilibrium and haplotype blocks, from the 244 SNP at the Interval Chr6: 26472035–26620975 bp encompassing the BTN family gene region included in Hapmap, we selected 215 SNPs (mean allelic frequency 0.935). Genotyping was performed using Sequenom's MassARRAY system (Sequenom Inc., San Diego, California, USA) according to manufacturer's specifications for the iPLEX chemistry using 10–15 ng genomic DNA.

### Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated using the  $\chi^2$ -test within each SNP in control population and only results that were in Hardy-Weinberg equilibrium were further analyzed. Patients were classified according to alleles and genotypes. Comparisons between groups were made using the Mann-Whitney  $U$ -test, the Student  $t$ -test or analysis of variance for continuous variables, and the  $\chi^2$ -test or the Fisher's exact probability test for categorical data. Backward logistic regression was used in the multivariate analysis to determine the factors associated with viral genotype infection. All values are presented as mean  $\pm$  s.d. A probability value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**Table 1.** Clinical and demographic characteristics of validation and fine-mapped cohorts

Covariate	Category	Fine-mapped cohort ( $n=841$ )	Validation cohort ( $n=637$ )
Mean age		46.02 $\pm$ 11.14	46.66 $\pm$ 11.21
Sex	Male	493 (58.6%)	394 (62.2%)
	Female	348 (41.4%)	239 (37.8%)
Genotype	1	749 (89.1%)	541 (84.9%)
	2		18 (2.8%)
	3	92 (10.9%)	55 (8.6%)
	4		23 (3.6%)
IL28B	CC	259 (31.4%)	196 (31.0%)
	CT	434 (52.5%)	324 (51.2%)
	TT	133 (16.1%)	113 (17.9%)
METAVIR Score	F0	22 (3.7%)	21 (3.6%)
	F1	283 (47.2%)	170 (27.1%)
	F2	170 (28.4%)	141 (22.8%)
	F3	73 (12.2%)	63 (10.3%)
	F4	51 (8.5%)	63 (10.3%)
Steatosis	Yes	46.6% (205/402)	9.5 (6/92%)

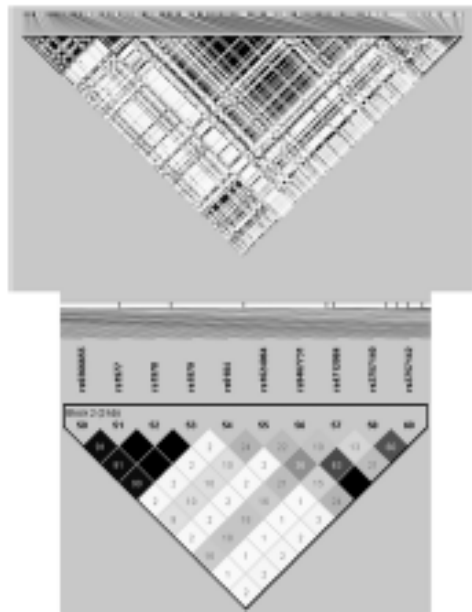


Figure 1. BTN1-3 gene region analyzed in this study. The fine mapped of chromosome-6 region covers approximately 150 Kb pairs including 5 butyrophilin-encoding genes and 244 SNPs.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work has been supported by Grant #P03/01192 of the Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Government.

**REFERENCES**

1 Grubely J, Page K, Sacke-Davies R, van der Loef MS, Roe TM, Brunescu J. InCI Study Group. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on

spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2014; **59**: 109-120.

2 Saito T, Ueno Y. Transmission of hepatitis C virus self-limiting hepatitis or chronic hepatitis? *World J Gastroenterol* 2013; **19**: 6967-6961.

3 Romero V, Acosta J, Zurriaga J, Canijo CP, Torres D, Gu X et al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC class II alleles in Hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol* 2008; **45**: 2409-2416.

4 Montes-Cano MA, Carr-Clay J, Romero-Gómez M, Diago M, Andrade R, Carreras I et al. HLA-C and IIR genes in hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2005; **66**: 1106-1109.

5 Cubero M, Gargot J, Ereban J, Garcia-Cebic D, Bar M, Perales C et al. Identification of host and viral factors involved in a distal resolution of a hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2014; **34**: 896-906.

6 Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; **461**: 798-801.

7 Zhu YZ, Qian XL, Zhao R, Qi ZT. How hepatitis C virus invade hepatocytes: the mystery of viral entry. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 3457-3467.

8 Rojas L, Ampuero J, Del Campo JA, Garcia-Lozano RI, Solís R, Ferris X et al. Fine mapping of the butyrophilin genomic region: Role in hepatitis C virus infection (HCV). *J Hepatol* 2014; **60**: S109.

9 Bekker V, Chanock SJ, Waage M, Huidobro AA, von Hahn T, Chen S et al. Genetic variation in C12orf1 and susceptibility to hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2011; **13**: 192-200.

10 Vigen MK, Bonhoff A, Olson M, Nielsen HC, Pociot F, Neup J et al. Reproducible association with type 1 diabetes in the extended class I region of the major histocompatibility complex. *Gene Immun* 2009; **10**: 323-333.

11 Le Page C, Marneau A, Botta PK, Rahimi K, Cyr L, Labouba I et al. BTND2 expression in epithelial ovarian cancer is associated with higher tumor-infiltrating T cells and a better prognosis. *PLoS One* 2012; **7**: e36541.

12 Barne M, Wood J, Chowdhury K, Whitton AM, Coll B, Mansour H et al. Evaluation of HLA polymorphisms in relation to schistosomiasis risk and infectious exposure. *Schistosome Bull* 2012; **38**: 1149-1154.

13 Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, Aباد-Molina C, Romero-Gómez M, Barneo N, Aguilera-Reina J et al. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010; **52**: 33-37.

14 Ampuero J, Romero-Gómez M, Reddy KR. Review article: HCV genotype 3 - the new treatment challenges. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; **39**: 686-698.

15 Horne SM, Gale M Jr. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 2011; **9**: 629-638.

16 Nakano S, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Guo X, Azenberg H et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; **306**: 672-674.

17 Tebbe BB, Cox AL. Immunity and hepatitis C: a review. *Curr Opin AIDS Hepatol* 2013; **10**: 51-58.

18 Andrade R, Urbani S, Casaly A, Reinos P, Zebiri A, Ahmed P et al. Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010; **138**: 1536-1545.

19 Meisel N, Marmeseder E, Sylvain A, Colla-Gonzalez J, Tribiun M, Chevillon B et al. Differential role for CD277 as a co-regulator of the immune signal in T and NK cells. *Eur J Immunol* 2011; **41**: 3448-3454.

Supplementary Information accompanies this paper on *Genes and Immunity* website (<http://www.nature.com/gene>)

## Insulin resistance predicts sustained virological response to treatment of chronic hepatitis C independently of the IL28b rs12979860 polymorphism

J. A. del Campo\*, J. Ampuero\*, L. Rojas\*, M. Conde†, Á. Rojas\*, M. Maraver\*, R. Millán\*, M. García-Valdecasas\*, J. R. García-Lozano†, M. F. González-Escribano† & M. Romero-Gómez\*

\*UCM Digestive Diseases and CIBERehd, Hospital Universitario de Valme, Sevilla, Spain.  
†Immunology Unit, HHUU Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

### Correspondence to:

Prof. M. Romero-Gómez, Unit for the Clinical Management of Digestive Diseases and CIBERehd, Hospital Universitario de Valme, Universidad de Sevilla, 41014 Sevilla, Spain.  
E-mail: mromerogomez@us.es

### Publication data

Submitted 3 July 2012  
First decision 22 July 2012  
Resubmitted 27 September 2012  
Accepted 9 October 2012  
EV Pub Online 5 November 2012

### SUMMARY

#### Background

Insulin resistance has been strongly associated with the attainment of sustained viral response (SVR) in hepatitis C patients.

#### Aim

To determine, in a cohort of Spanish patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon plus ribavirin (P+R), whether insulin resistance predicts SVR independently of interleukin-28B rs12979860 polymorphism.

#### Methods

Insulin resistance was measured as [HOMA-IR = Insulin (IU/mL) \* glucose (mmol/L)/22.5]. Genotype, viral load and histological fibrosis using Scheuer score were also measured. Binary logistic regression analysis was used for statistical purposes.

#### Results

In a cohort of 240 patients [78% genotype 1, 24% showing advanced fibrosis, 71% high viral load ( $\geq 800\,000$  IU/mL), 31% IL28b genotype CC and 50% with HOMA  $>2$ ] treated with P+R, 126 (53%) reached SVR. HOMA-IR index (HOMA  $<2$ : 63% vs. HOMA  $>2$ : 42%;  $P = 0.001$  and IL28b genotype CC: 68% vs. genotype CT/TT: 45%;  $P = 0.002$ ) were significantly associated with SVR. In multivariable logistic regression analysis in the overall cohort, variables independently associated were: viral genotype OR: 0.29 (95% CI: 0.11–0.78),  $P = 0.01$ ; fibrosis OR: 1.62 (95% CI: 1.22–2.16),  $P = 0.001$ ; HOMA-IR OR: 1.22 (95% CI: 1.02–1.47),  $P = 0.03$ ; and IL28B genotype OR: 2.43 (95% CI: 1.45–4.07),  $P = 0.001$ . The analyses also showed that degree of steatosis, HOMA-IR  $>2$ , mild fibrosis and IL28B CC genotype were significantly related to SVR in patients infected with HCV genotypes 1&4, but not in those with genotypes 2&3. No differences were seen in glucose, insulin level or HOMA-IR index segregated according to IL28B genotypes.

#### Conclusion

Our results suggest that insulin resistance, fibrosis stage and IL28B polymorphisms were independent variables associated with sustained viral response.

*Aliment Pharmacol Ther* 2013; **37**: 74–80



## INTRODUCTION

In patients with chronic hepatitis C infection, sustained virological response (SVR) rate variability is extremely high following standard care therapy with peginterferon + ribavirin (P+R). Viral genotype, viral load, fibrosis stage and metabolic disturbances including obesity, insulin resistance and steatosis have been shown to be the main factors influencing SVR.<sup>1</sup> In two recent meta-analyses, insulin resistance was strongly associated with the probability of achieving SVR.<sup>2, 3</sup> Furthermore, Ge *et al*<sup>4</sup> conducted a Genome Wide Association Study (GWAS) in 1137 patients and demonstrated that in patients bearing CC in the position rs12979860 in 19q13 region, the probability of achieving SVR was double that of those with CT/TT. The IL28B rs12979860 polymorphism was associated with a higher probability of achieving SVR independently of fibrosis stage, viral genotype and viral load.<sup>5</sup> Ogawa *et al*.<sup>6</sup> showed that, in Japanese HCV genotype 1-infected patients, both IL28B rs8099917 polymorphism and baseline HOMA-IR were independent pre-treatment predictors of SVR in patients treated with P+R, and that HOMA-IR appeared to underline IL28B predictability of response. However, these findings need to be validated in Occidental patients. SVR rate seems to be similar in patients receiving dual or triple therapy when genotype CC is present, or in patients achieving rapid virological response (RVR).<sup>7</sup> Indeed, RVR was more often seen in patients with genotype CC.<sup>8</sup> Thus, definitions of host and viral factors influencing RVR rates in patients with genotype CC could be extremely useful in clinical practice.

The main aim of the present study was to determine, in a cohort of Spanish patients with chronic hepatitis C treated with P+R, whether insulin resistance predicts SVR independently of interleukin-28B rs12979860 polymorphism. The impact of genotype on RVR and SVR in patients receiving P+R treatment was also assessed.

## PATIENTS AND METHODS

Consecutive treatment-naïve patients with chronic hepatitis C attending our outpatient clinic since 2007 were recruited to receive treatment with P+R. All patients received peginterferon alfa-2a (180 µg/kg bodyweight) plus genotype- and weight-related ribavirin (genotypes 1&4 received 1000 mg/d when weight <75 kg and 1200 mg/d when weight ≥75 kg; genotypes 2&3 received 800 mg/d in all cases). Based on viral genotype, the treatment was for 24 weeks (genotypes 2 and 3) or 48 weeks (genotypes 1 and 4). The Valme University Hospital Ethics Committee approved the protocol and

fully informed written consent was obtained from all patients prior to entry into the study. History of alcohol consumption was obtained by two clinical researchers using standardised interview. No patient had been previously treated with direct antiviral drugs. Patients with a type 2 diabetes mellitus, or showing fasting glucose >7 mmol/L, were also excluded.

## Laboratory investigations

An overnight (12 h) fasting blood sample was taken for routine clinical chemistry analyses. These included ALT, AST, alkaline phosphatase, γGT, cholesterol and triglycerides. All patients had positive anti-HCV as measured using EIA3 (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA), increased ALT and positive HCV RNA in serum. HBsAg, anti-HBc, anti-HIV were tested using commercially available kits (Abbott Laboratories). All patients were negative for HBsAg and anti-HIV. Fasting samples of serum obtained after centrifugation were stored in aliquots at -70°C until assayed. Serum insulin levels were measured by electrochemiluminescence immunoassay, (ECLIA) using an Elecsys 1010/2010 autoanalyser (Elecsys MODULAR ANALYTICS E170; Roche, Basel, Switzerland). The insulin resistance index was calculated using fasting values of plasma glucose and insulin, according to the HOMA model formula:

$$\text{Insulin resistance or HOMA-IR} = \frac{\text{fasting insulin (IU/L)} \times \text{fasting glucose (mmol/L)}}{\div 22.5}$$

As previously recommended, insulin resistance was arbitrarily considered altered when higher than 2.<sup>1</sup> Height and weight were determined at baseline and the body mass index (BMI) was calculated as weight (in kg) ÷ height (in m<sup>2</sup>).

## Liver histology

Percutaneous liver biopsy was performed under ultrasound control. We assessed grading and staging separately. Stage was defined according to the Scheuer fibrosis score in which F0 = absence, F1 = enlarged portal tracts, F2 = periportal or portoportal septa, F3 = fibrosis with architectural distortion, and F4 = cirrhosis. Necroinflammatory activity was determined by combining scores for portal inflammation (0–4) and lobular necrosis (0–4). Steatosis was quantified as the percentage of hepatocytes that contained fat droplets between <5% (absent) and 100% (all hepatocytes containing fat droplets). The grades assigned were: 0 if no steatosis (<5%), grade 1 when <25%

of hepatocytes contained fat droplets, grade 2 when between 25% and 50% showed steatosis and grade 3 when >50% of hepatocytes showed fat storage. For statistical purposes, patients were classified as 'no steatosis' (grade 0) and 'steatosis' (grades 1, 2 and 3).

#### Virology assessments

HCV genotyping was performed with INNO-LIPA HCV II kits (Innogenetics, Zwijnaarden, Belgium), which were used according to the manufacturer's instructions. A Cobas Taqman (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) was used to quantify the HCV RNA levels in serum. Serum samples were diluted for measurement when values were beyond the linear range of the method. The level of detection was 15 IU/mL, and all patients were HCV RNA-positive.

#### IL28B genotyping

DNA from patients was extracted from peripheral blood using standard methods. Genotyping of the rs12979860 was performed using a TaqMan 5' allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers used were 5' GCCTGTCGTACTGAACCA 3' (forward) and 5' GCGCGGAGTGCAATTCAAC 3' (reverse), and the TaqMan MGB probe sequences were 5' TGGTTCGCGCCTTC 3' and 5' CTGGTTCACGCC TTC 3'. The probes were labelled with the fluorescent dyes VIC and FAM respectively. PCR reactions were performed in a total volume of 8  $\mu$ L with the following amplification protocol: denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 92°C for 15 s and finished with annealing and extension at 60°C for 1 min. Genotyping of each sample was automatically attributed by the SDS 1.3 software (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA) for allelic discrimination.

#### Statistical analyses

Comparisons between groups were made using the Mann-Whitney *U*-test, the Student *t*-test or ANOVA for continuous variables, and the  $\chi^2$  or the Fisher exact probability test for categorical data. The Spearman coefficient was used to correlate numerical variables that were non-normally distributed. All values are presented as means  $\pm$  s.d. A probability value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Backward logistic regression was used in the multivariate analysis to determine the factors associated with sustained response. These included baseline variables and, in a second pass, included on-treatment variables such as rapid virological response (RVR). RVR was also evaluated as a treatment outcome. Variables included in the analyses were age, gender, hepatic steato-

sis, BMI, GGT, insulin resistance, fibrosis, viral genotype, HCV RNA levels and IL28B genotypes.

## RESULTS

#### Baseline characteristics of the overall cohort

Patients ( $n = 240$ ) with biopsy-proven chronic hepatitis C (HCV RNA positive) were treated with peginterferon alfa-2a plus ribavirin (P+R). Gender distribution was 60% (144/240) male and 40% (96/240) female, with an overall mean age of  $45 \pm 10$  years (range: 18–69). Genotype distributions were: genotype 1 ( $n = 188$ ), genotype 2 ( $n = 3$ ), genotype 3 ( $n = 30$ ) and genotype 4 ( $n = 19$ ).

#### Baseline variables associated with sustained virological response (SVR)

In the univariate analysis, factors associated with SVR in genotypes 1&4 were: age, steatosis degree, fibrosis stage, HOMA index and interleukin 28B polymorphisms. SVR was achieved in 49.3% (102/207) of cases with genotypes 1&4 (Table 1). The SVR rate was 70% in those with mild fibrosis (F0–F2) and 30% in advanced fibrosis (F3–F4) ( $P = 0.0001$ ). Hepatocyte steatosis was associated with poorer SVR rates (32.3% vs. 61%;  $P = 0.001$ ). HOMA-IR  $>2$  was associated with poorer SVR response (39.3% vs. 58.7%;  $P = 0.007$ ). Younger age was associated with poorer response ( $42.9 \pm 10.6$  vs.  $46.2 \pm 9.4$ ;  $P = 0.02$ ). Lastly, IL28B genotypes were significantly ( $P = 0.004$ ) associated with SVR genotype CC 39/58 (67.2%) vs. genotype CT/TT 59/145 (40.7%). Using reverse stepwise logistic multivariable regression analysis, the independent variables related to SVR were: steatosis degree (OR: 0.22; 95% CI: 0.09–0.53;  $P = 0.001$ ), HOMA-IR  $>2$  (OR: 0.44; 95% CI: 0.17–0.97;  $P = 0.04$ ), mild fibrosis (OR: 1.97; 95% CI: 1.28–3.03;  $P = 0.002$ ) and IL28B genotype CC (OR: 2.25 95% CI: 1.12–4.56;  $P = 0.024$ ). There were no statistically significant associations with gender distribution, viral load, body mass index, alcohol consumption or cholesterol concentrations. Conversely, patients with HOMA-IR  $>2$  showed steatosis in 50% of cases, while steatosis was present in 39.7% of cases when HOMA-IR was  $<2$  ( $P > 0.05$ ).

By contrast, we did not find factors associated with SVR in patients with genotypes 2&3. There were no significant associations with age, gender distribution, steatosis degree, fibrosis stage, viral load, HOMA index, body mass index, alcohol consumption or cholesterol concentrations. SVR was achieved in 72.7% of cases (24/33) with genotypes 2&3. The SVR was not associated with fibrosis, steatosis or IL28B polymorphisms in genotypes 2/3 patients (Table 2).



**Table 1 | Analysis of variables associated with sustained virological response (SVR) in patients with genotypes 1&4**

N = 203 Variable	Univariate analysis			Logistic regression	
	SVR	Non-SVR	P	OR (95% CI)	P
<b>IL28B</b>					
CC	39 (67.2%)	19 (32.8%)	<b>0.004</b>	2.25 (1.12–4.56)	0.024
CT	48 (41.7%)	67 (58.3%)			
TT	11 (39.3%)	17 (60.7%)			
<b>Gender</b>					
Male	56 (46.7%)	64 (53.3%)	0.378		
Female	46 (52.9%)	41 (47.1%)			
Age	42.9 ± 10.6	46.2 ± 9.4	0.020		
<b>Viral load (VL)</b>					
High VL	71 (47.7%)	78 (52.3%)	0.387		
Low VL	31 (54.4%)	26 (45.6%)			
<b>Rapid viral response (RVR)</b>					
RVR	24 (100%)	0 (0%)	<b>0.0001</b>		
Non-RVR	35 (42.2%)	48 (57.8%)			
<b>HOMA-IR</b>					
>2	35 (39.3%)	54 (60.7%)	<b>0.007</b>	0.44 (0.17–0.97)	0.04
≤2	61 (58.7%)	43 (41.3%)			
<b>Steatosis</b>					
Yes	20 (32.3%)	42 (67.7%)	<b>0.001</b>	0.22 (0.09–0.53)	0.001
No	50 (61.0%)	32 (39.0%)			
<b>Fibrosis</b>					
F0–F1	47 (64.4%)	26 (35.6%)	<b>0.002</b>	1.97 (1.28–3.03)	0.002
F2	21 (37.5%)	35 (62.5%)			
F3–F4	15 (30%)	35 (70%)			
Viral load (log IU/mL)	6.16 ± 0.80	6.29 ± 0.76	0.264		
Viral load week 4 (log IU/mL)	2.63 ± 1.64	4.85 ± 1.09	<b>0.0001</b>		
Viral load week 12 (log IU/mL)	1.23 ± 0.54	3.05 ± 1.68	<b>0.0001</b>		
BMI	26.43 ± 6.13	25.78 ± 3.31	0.372		
Glycaemia (mg/dL)	94.24 ± 21.27	100.24 ± 27.69	0.086		
HOMA-IR	2.20 ± 1.33	3.12 ± 2.54	<b>0.002</b>		
ALT (IU/mL)	93.79 ± 62.43	101.94 ± 95.21	0.466		
GGT (IU/mL)	64 ± 73.48	96.79 ± 105.88	<b>0.011</b>		
Total cholesterol (mg/dL)	177.48 ± 40.5	170.75 ± 30.03	0.177		
LDL (mg/dL)	91.80 ± 45.14	93.31 ± 30.71	0.852		
Triglycerides (mg/dL)	99.71 ± 60.36	97.94 ± 69.07	0.846		
Platelets (K/μL)	218000 ± 61948	195570 ± 63632	<b>0.011</b>		

Bold values indicate  $P < 0.05$ .

Analyses applied were univariate analysis ( $\chi^2$  test or Fisher test for categorical variables and Student t-test or U-Mann-Whitney for continuous variables) and multivariable analysis (binary logistic regression).

In patients with the IL28B genotype CC, SVR was achieved in 48 of 71 patients (68%). Genotype 1&4 patients without SVR bearing the IL28B genotype CC had higher HOMA-IR scores ( $3.37 \pm 3.07$  vs.  $2.13 \pm 0.98$ ;  $P = 0.023$ ) and more advanced stage of fibrosis ( $2.53 \pm 0.97$  vs.  $1.59 \pm 1.04$ ;  $P = 0.02$ ). In multivariable analysis using logistic regression, higher values of HOMA-IR were independently related to non-SVR in genotype CC IL28B patients (OR: 1.43 (95% CI: 1.03–2.01;  $P = 0.022$ ). However, we observed no influence of viral load or hepatocyte steatosis. We observed no significant associations in patients with genotypes 2&3.

**Factors associated with IL28B polymorphism**

Insulin resistance values were not related to IL28B genotypes (HOMA-IR in genotype CC:  $2.54 \pm 1.97$  vs. genotype CT:  $2.88 \pm 2.36$  vs. genotype TT:  $2.68 \pm 2.44$ ;  $P = 0.59$ ). Neither were fibrosis (genotype CC:  $2.08 \pm 1.14$  vs. genotype CT:  $1.87 \pm 1.20$  vs. genotype TT:  $1.92 \pm 1.18$ ;  $P = 0.51$ ); viral load (genotype CC:  $6.27 \pm 0.77$  vs. genotype CT:  $6.16 \pm 0.74$  vs. genotype TT:  $6.09 \pm 0.85$ ;  $P = 0.47$ ); and body mass index (genotype CC:  $26.9 \pm 6.6$  vs. genotype CT:  $25.8 \pm 3.7$  vs. genotype TT:  $25.6 \pm 3.6$ ;  $P = 0.32$ ) related to IL28B genotypes (Figure 1).



**Table 2 | Analysis of variables associated with sustained virological response (SVR) in patients with genotypes 2&3**

Variable	Univariate analysis		P
	SVR	Non-SVR	
<b>N = 33</b>			
<b>IL28B</b>			
CC	9 (69.2%)	4 (30.8%)	0.523
CT	11 (68.8%)	5 (31.2%)	
TT	3 (100%)	0 (0%)	
<b>Gender</b>			
Male	18 (75%)	6 (25%)	0.677
Female	6 (66.7%)	3 (33.3%)	
Age	43.63 ± 8.6	45.7 ± 9.8	0.590
<b>Viral load</b>			
High VL	14 (70%)	6 (30%)	0.999
Low VL	10 (76.9%)	3 (23.1%)	
<b>RVR</b>			
Non-RVR	13 (86.7%)	2 (13.3%)	0.999
	2 (100%)	0 (0%)	
<b>HOMA-IR</b>			
>2	10 (58.8%)	7 (41.2%)	0.229
≤ 2	11 (84.6%)	2 (15.4%)	
<b>Steatosis</b>			
Yes	8 (61.5%)	5 (38.5%)	0.405
No	8 (80%)	2 (20%)	
<b>Fibrosis</b>			
FO-F1	6 (85.7%)	1 (14.3%)	0.572
F2	7 (77.7%)	2 (22.3%)	
F3-F4	4 (50%)	4 (50%)	
Viral Load (log IU/mL)	5.97 ± 0.75	6.24 ± 0.46	0.215
BMI	26.33 ± 3.78	25.9 ± 1.48	0.655
Glycaemia (mg/dL)	95.79 ± 14.83	99.89 ± 14.41	0.482
HOMA-IR	2.24 ± 0.89	2.87 ± 2.35	0.452
ALT (UI/mL)	114.67 ± 75.94	131.89 ± 73.47	0.561
GGT (UI/mL)	48.61 ± 32.03	82.22 ± 44.32	0.061
Total cholesterol (mg/dL)	162.88 ± 43.26	146.56 ± 32.97	0.261
LDL (mg/dL)	102.20 ± 26.22	87.47 ± 33.93	0.399
Triglycerides (mg/dL)	80.29 ± 30.81	80.67 ± 27.86	0.974
Platelets (K/μL)	195458 ± 72573	163666 ± 54064	0.189

Analyses applied: univariate analysis ( $\chi^2$  test or Fisher test for categorical variables and Student t-test or U-Mann-Whitney for continuous variables).

**Factors associated with rapid virological response**

In genotypes 1&4, viral clearance at week 4 was more often seen in younger patients, low viral load and genotype IL28B CC. However, HOMA-IR <2 was associated with lower HCV RNA at week 4 (3.23 ± 1.64 vs. 4.05 ± 1.87 Log<sub>10</sub>IU/mL). Body weight and fibrosis stage did not reach statistical significance. Binary logistic regression confirmed IL28B genotype CC (OR: 20; 95% CI:

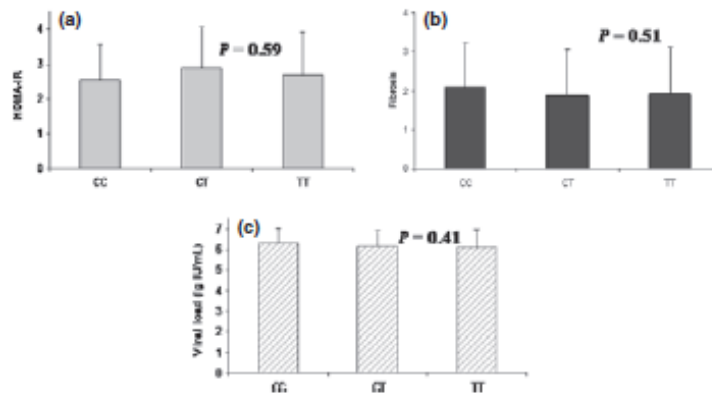
3.86–90.9); fibrosis (OR: 0.51; 95% CI: 0.26–1.03) and low viral load (OR: 6.99; 95% CI: 1.46–33.33) as independent variables associated with RVR. In patients bearing IL28B genotype CC, viral load was the only independent variable associated with RVR. We did not find any statistically significant association in patients with genotypes 2&3.

**Impact of RVR on sustained virological response (SVR)**

RVR values were available in 124 patients, 107 infected by genotypes 1&4 and 17 patients with genotypes 2&3. RVR was closely related to SVR; 37 of 39 patients (95%) with RVR achieved SVR. Introducing RVR together with baseline variables into the multivariable analysis showed that RVR (OR: 34; 95% CI: 5–216; P < 0.0001) and HOMA-IR >2 (OR: 0.63; 95% CI: 0.45–0.87; P < 0.005) were independently related to SVR, while other markers of interferon sensitivity such as IL28B genotype CC, HCV genotype and fibrosis stage did not enter into the final equation.

**DISCUSSION**

Our results indicate that insulin resistance, together with fibrosis stage and IL28B polymorphisms, was independently associated with sustained virological response in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon plus ribavirin (P+R). The outcomes were confined to patients with genotypes 1&4, and not with genotypes 2&3. IL28B genotypes 1&4 have been reported to be strongly related to SVR,<sup>3, 9</sup> but not genotypes 2&3 and, as such, suggests a predictive capacity of this baseline variable in difficult-to-treat subgroups of patients.<sup>10</sup> However, the functionality of the rs12979860 polymorphism remains controversial. This genetic variant does not promote changes in the IL28B protein and the mechanism by which this mutation can modify interferon sensitivity remains unclear.<sup>11</sup> Viral load and viral genotypes are the major viral factors influencing SVR, while fibrosis stage, metabolic disorders and IL28B polymorphisms remain as major host factors related to SVR. Close co-linearity has been reported among several variables e.g. insulin resistance, age, fibrosis stage, steatosis, obesity and GGT levels,<sup>12</sup> while HOMA index has been strongly related to SVR.<sup>2</sup> This association can be of considerable importance as it has been well documented that hepatitis C is closely related to insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, the prevalence of which has been shown to be increased in this patient population. Despite our data being based on only 33 subjects with genotypes 2/3 included in the current cohort, our findings



**Figure 1** | Insulin resistance (HOMA-IR), fibrosis stage and viral load are not related to IL28B polymorphism. The relationship between: (a) insulin resistance (HOMA-IR), (b) fibrosis stage and (c) viral load vs. rs12979860 polymorphism were evaluated in chronic hepatitis C patients. No statistically significant associations were observed.

are in accord with previous reports from Stättermayer *et al.*<sup>10</sup> However, there may be insufficient power to find a relationship between these variables and SVR.

The relationship between insulin resistance measured by HOMA and IL28B genotype is subject to debate. Stättermayer *et al.*<sup>13</sup> reported a strong association between IL28B genotype CC and lower HOMA score in a cohort of 202 patients with chronic hepatitis C genotype 1 or 4, suggesting a link between insulin resistance and genetic variant that could help explain the association between HOMA and SVR. However, our study (and that by Huang *et al.*<sup>14</sup>) observed no such association between baseline HOMA values and IL28B genotypes. A recent study by Ogawa *et al.*<sup>6</sup> showed that the distributions of the IL28B rs8099917 polymorphism were not related to HOMA-IR values and, also, the polymorphism was an independent baseline predictor of SVR response to treatment. Despite insulin resistance being associated with fibrosis stage, both variables remained independently associated with SVR. However, Fattovich *et al.*<sup>15</sup> found that in HCV genotype 1 patients, IL28B polymorphisms, HCV RNA load and IP-10 could independently predict SVR. These authors found that HOMA-IR score was not associated with viral response. On the other hand, our results showed that IL28B polymorphisms were not related to fibrosis stage or HOMA score, which highlights the weakness of the interaction between them and strength of the relationship with SVR. Hepatitis C virus could influence insulin signalling by promoting insulin resistance mediated by IRS-1 and IRS-2 degradation by several pathways, depending on viral genotype.<sup>16</sup> The influence of host genetic factors on this

interaction needs to be validated in further studies. For example, hepatitis C virus appears to modify lipid metabolism, according to IL28B genotype. Lower pre-treatment serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels have been shown to be associated with poor response to peginterferon/ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C.<sup>17, 18</sup> IL28B polymorphisms influence the biological relationships between HCV infection and serum LDL and the clinical value of LDL in predicting response to pegIFN/RBV therapy,<sup>19</sup> the conclusion being that the clinical value of serum LDL in predicting SVR is clear only for those patients heterozygous for *IL28B* genotype.

Insulin resistance appears not to be predictive of SVR in patients receiving telaprevir-based triple therapy,<sup>20</sup> at least in treatment-naïve and relapser patients. The impact of insulin resistance in more difficult-to-treat patients such as null-responders requires further investigation. Interestingly, our present study demonstrated that viral clearance was associated with improvement in insulin sensitivity, thus supporting the link between viral replication and insulin resistance.

In treatment-naïve genotype 1&4 patients bearing IL28B genotype CC and patients reaching RVR (which could be tested during the lead-in-phase, at least in patients scheduled to receive boceprevir), similar SVR rates were achieved when treated with double or triple therapy.<sup>21</sup> In these groups of patients, adding HOMA-IR could help in clinical decision making. Indeed, non-responder patients bearing IL28B genotype CC appear to have more advanced disease and higher HOMA-IR index. Despite the association of HOMA-IR with SVR



noted in this study being modest, there is a potential use of this index in patients with chronic hepatitis C and favourable genotype CC. In such circumstances, HOMA-IR could help segregate treatment-resistant subgroups of patients who may benefit, instead, from triple therapy. However, these postulations need to be demonstrated and validated in further studies.

In summary, our data indicate that IL28B genotypes, HOMA-IR and fibrosis remain the independent variables predicting SVR in patients treated with peginterferon + ribavirin, particularly in patients with genotypes 1&4. RVR is a major on-treatment variable together with insulin resistance index, while all of the other variables studied (HOMA-IR, IL28B genotype CC, RVR) could be very useful in decision making in the management of hepatitis C infection.

#### AUTHORSHIP

*Guarantor of the article:* Prof. Manuel Romero-Gómez.  
*Author contributions:* JAdC, JA, JRGL, MFGE and MRG designed research study, analysed the data and wrote the paper. LR, MC, AR, MG V, MM and RM collected and analysed the data. All authors approved the final version of the manuscript.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

*Declaration of personal interests:* Writing support was provided by Peter R. Turner from Tscimed.com.

*Declaration of funding interests:* This study was funded by Junta de Andalucía (CS 448/09) and Instituto Carlos III (PI 10/00611).

#### REFERENCES

- Romero-Gómez M, Del Mar Viloria M, Andrade RJ, *et al*. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2005; **128**: 636–41.
- Islam M, Aparcero R, Kawaguchi T, *et al*. Meta-analysis: insulin resistance and sustained virological response in hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; **34**: 297–305.
- Deltre P, Louvet A, Lemoine M, *et al*. Impact of insulin resistance on sustained response in HCV patients treated with pegylated interferon and ribavirin: a meta-analysis. *J Hepatol* 2011; **55**: 1187–94.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, *et al*. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; **461**: 399–401.
- Asselah T, Essioux L, Marcellin P. A chromosome 19 SNP (rs12979860) predicts outcome (EVR/SVR) in HCV patients treated with interferon, independent of pegylation or ribavirin. *J Hepatol* 2010; **52**: 1180A.
- Ogawa E, Furusyo N, Murata M, *et al*. Insulin resistance undermines the advantages of IL28B polymorphism in the pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment of chronic hepatitis C patients with genotype 1. *J Hepatol* 2012; **57**: 534–40.
- Poordad F, McCone J, Bacon BR, *et al*. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1195–206.
- McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, *et al*. Replicated Association between an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Gastroenterology* 2010; **138**: 2307–14.
- Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, Abad-Molina C, *et al*. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010; **52**: 33–37.
- Stättermayer AF, Stauber R, Hofer H, *et al*. Impact of IL28B genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; **9**: 344–350.
- Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic variation of the IL-28B promoter affecting gene expression. *PLoS ONE* 2011; **6**: e26620.
- Romero Gomez M. Insulin resistance and sustained virological response in hepatitis C: from bench to bedside. *Liver Int* 2011; **31**: 1–3.
- Stättermayer AF, Rutter K, Beinhardt S, *et al*. Association of the IL28B genotype with insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2012; **57**: 492–8.
- Huang JF, Yu ML, Huang CF, *et al*. The outcomes of glucose abnormalities in pre-diabetic chronic hepatitis C patients receiving peginterferon plus ribavirin therapy. *Liver Int* 2012; **32**: 962–969.
- Fatovich G, Covolo L, Bibert S, *et al*. IL28B polymorphisms, IP-10 and viral load predict virological response to therapy in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; **33**: 1162–72.
- Pazienza V, Clément S, Pugnale P, *et al*. The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms. *Hepatology* 2007; **45**: 1164–71.
- Ramcharan D, Wahed AS, Conjeevaram HS, *et al*. Associations between serum lipids and hepatitis C antiviral treatment efficacy. *Hepatology* 2010; **52**: 854–863.
- Harrison SA, Rossaro L, Hu KQ, *et al*. Serum cholesterol and statin use predict virological response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatology* 2010; **52**: 864–874.
- Clark PJ, Thompson AJ, Zhu M, *et al*. Interleukin 28B polymorphisms are the only common genetic variants associated with low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in genotype-1 chronic hepatitis C and determine the association between LDL-C and treatment response. *J Viral Hepat* 2012; **19**: 332–40.
- Serfaty L, Forns X, Goeser T, *et al*. Insulin resistance and response to telaprevir plus peginterferon  $\alpha$  and ribavirin in treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1. *Gut* 2012; **61**: 1473–80.
- Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, *et al*. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2011; **364**: 1207–17.



---

## **ANEXO II: APORTACIONES A CONGRESOS**



---

I. **Título de la aportación:** A GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY IDENTIFIED A NOVEL SUSCEPTIBILITY LOCUS GENE PBK (RS 17388536) FOR SUSTAINED VIROLOGICAL RESPONSE IN PATIENTS BEARING IL28B GENOTYPE CC

**Nombre del congreso:** The International Liver Congress™ – 47th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2012

**Lugar:** Barcelona, España

**Autores:** ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Maraver-Zamora, Marta; Ortiz-Fernández, Lourdes; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Conde, Marta; García-Valdecasas-Merino, Marta María; García-Lozano, José Raúl; Campo-Castillo, José Antonio del; Solá, Ricard; Forns, Xavier; Moreno-Otero, Ricardo; Andrade-Bellido, Raúl J.; Diago, Moisés; Salmerón-Escobar, Francisco Javier; Rodrigo, Luis; Pons, José Antonio; Navarro-Jarabo, José María; Calleja-Panero, José Luis; García-Samaniego, Javier; Butti, María; CANO-MEDEL, CRISTINA; Millán, Marina; MILLAN-DOMINGUEZ, RAQUEL; González-Escribano, María Francisca; Romero-Gómez, Manuel

II. **Título de la aportación:** Statins interfere on TCTP and PI3K/AKT/mTOR pathway and inhibit hepatocellular carcinoma progression.

**Nombre del congreso:** AASLD The Liver Meeting® 2014

**Tipo de evento:** Póster en Congreso.

**Ámbito:** Internacional.

**Año:** 2014

**Lugar:** BOSTON, MASSACHUSETTS, USA

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Gil-Gómez, Antonio; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Muntane-Relat, Jordi; Padillo-Ruiz, Francisco Javier; Romero-Gómez, Manuel; Campo-Castillo, José Antonio del

III. **Título de la aportación:** Quercetin inhibits both replication and assembly of hepatitis C virus by blocking the viral NS3 and the host diacylglycerol acyltransferase type 1

**Nombre del congreso:** AASLD The Liver Meeting® 2014

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2014

**Lugar:** BOSTON. USA

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Clement, Sophie; Lemasson, Matthieu ; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Gil-gómez, Antonio; Ranchal, Isidora; Bautista-Palomas, Juan Dionisio; Rosenberg, Arielle R; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel

IV. **Título de la aportación:** Identificación de miRNAs circulantes en la Enfermedad Celiaca

**Nombre del congreso:** XLV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

---

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Autonómico.

**Año:** 2014

**Lugar:** Cádiz, España

**Autores:** Fombuena-Rubio, Blanca; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Del Campo-castillo, José Antonio; Ampuero-Herrojo, Javier; Rico-gutierrez, Maria Carmen; Romero-Gómez, Manuel

V. **Título de la aportación:** EFECTO DEL FLAVONOIDE QUERCETINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HUH7 CON PNPLA3 GENOTIPO GG

**Nombre del congreso:** XLV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Autonómico.

**Año:** 2014

**Lugar:** Cádiz, España

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Ranchal, Isidora; Clement, Sophie; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel

VI. **Título de la aportación:** La quercetina inhibe la replicación y el ensamblaje del virus de la hepatitis C, bloquea la actividad de la proteasa NS3 y de DGAT.

**Nombre del congreso:** XLV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Autonómico

**Año:** 2014

**Lugar:** Cádiz

**Autores:** Clement, Sophie; Lemasson, Matthieu; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Gil-gómez, Antonio; Ranchal, Isidora; Bautista-Palomas, Juan Dionisio; Rosenberg, Arielle R; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles

VII. **Título de la aportación:** LAS ESTATINAS MODIFICAN TCTP Y LA VÍA PI3K/AKT/MTOR INHIBIENDO LA PROGRESIÓN DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR EN UN MODELO IN VITRO.

**Nombre del congreso:** XLV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Autonómico.

**Año:** 2014

**Lugar:** Cádiz, España

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Gil, Antonio; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Ampuero-Herrojo, Javier; Muntane-Relat, Jordi; Padillo-Ruiz, Francisco Javier; Gallego-Durán, Rocío; Fombuena-Rubio, Blanca; Romero-Gómez, Manuel; Campo-Castillo, José Antonio del



---

VIII. **Título de la aportación:** REGULATION OF THE AKT/MTOR PATHWAY BY METFORMIN IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA DEVELOPMENT UPON HCV INFECTION.

**Nombre del congreso:** The International Liver Congress 2014, 49th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver.

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2014

**Lugar:** Londres

**Autores:** Campo -Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Romero-Gómez, Manuel.

IX. **Título de la aportación:** QUERCETIN MODULATES LIPIDS DROPLETS IN Huh7 CELLS BEARING PNPLA3 GENOTYPE GG

**Nombre del congreso:** The International Liver Congress 2014, 49th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver.

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2014

**Lugar:** Londres

**Autores:** Ranchal, Isidora; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Clement, Sophie; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles.

X. **Título de la aportación:** EFECTO DEL FLAVONOIDE QUERCETINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CÉLULAS HUH7 CON PNPLA3 GENOTIPO GG.

**Nombre del congreso:** XXXIX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO (AEEH).

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2014

**Lugar:** MADRID, ESPAÑA

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Ranchal, Isidora; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Clement, Sophie; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel.

XI. **Título de la aportación:** Papel de la regulación de la expresión génica y epigenética (microRNAs) relacionada con el desarrollo de hepatocarcinoma en un modelo in vitro de infección por el virus de la Hepatitis C. Efecto de la metformina.

**Nombre del congreso:** XXXIX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO (AEEH).

**Tipo de evento:** Póster en congreso

---

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2014

**Lugar:** - MADRID, ESPAÑA

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Pawlotsky, Jean Micheal; Muntane-Relat, Jordi; Padillo-Ruiz, Francisco Javier; Romero-Gómez, Manuel; Campo-Castillo, José Antonio del.

XII. **Título de la aportación:** LA QUERCETINA INHIBE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, MODIFICA EL METABOLISMO LIPÍDICO, LA MORFOLOGÍA DE LOS LDS Y LA LOCALIZACIÓN DE CORE.

**Nombre del congreso:** XXXIX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO (AEEH).

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2014

**Lugar:** Madrid, España

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Ranchal, Isidora; Clement, Sophie; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel.

XIII. **Título de la aportación:** QUERCETIN INHIBITS HEPATITIS C VIRUS REPLICATION BY MODULATING LIPID METABOLISM, LIPID DROPLETS MORPHOLOGY AND CORE PROTEIN LOCALIZATION.

**Nombre del congreso:** TRANSLATIONAL RESEARCH IN CHRONIC VIRAL HEPATITIS - BRIDGING BASIC SCIENCE AND CLINICAL RESEARCH.

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2013

**Lugar:** LYON, FRANCIA

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Ranchal, Isidora; Clement, Sophie; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel.

XIV. **Título de la aportación:** Quercetin inhibits HCV replication by modulating lipid droplets morphology and core protein co-localization.

**Nombre del congreso:** AASLD The Liver Meeting® 2013

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2013

**Lugar:** WASHINGTON, ESTADOS UNIDOS

---

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Clement, Sophie ; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel.

XV. **Título de la aportación:** LA QUERCETINA INHIBE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C, MODIFICA EL METABOLISMO LIPÍDICO, LA MORFOLOGÍA DE LOS LIPID DROPLETS Y LA LOCALIZACIÓN DE CORE

**Nombre del congreso:** XLIV REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Ponencia en Congreso

**Ámbito:** Autonómico

**Año:** 2013

**Lugar:** SEVILLA

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Ranchal, Isidora; Clement, Sophie; Negro, Francesco; Romero-Gómez, Manuel.

XVI. **Título de la aportación:** Role of protein tyrosine-phosphatase 1B (PTP1B) activity in HCV-induced Hepatocellular carcinoma: an in vitro analysis.

**Nombre del congreso:** 48th meeting of the European association for the study of the liver.

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2013

**Lugar:** Amsterdam, Netherlands

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Romero-Gómez, Manuel; Campo-Castillo, José Antonio del.

XVII. **Título de la aportación:** FUNCTIONAL ANALYSIS OF DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE ACTIVITY-1(DGAT1) IN THE REPLICATION OF HEPATITIS C VIRUS: EFFECT OF QUERCETIN.

**Nombre del congreso:** The International Liver Congress 2013. 48th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver.

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2013

**Lugar:** AMSTERDAM

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Romero-Gómez, Manuel.

XVIII. **Título de la aportación:** ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA ACTIVIDAD DE LA DIACILGLICEROL ACIL TRANSFERASA 1 (DGAT1) EN LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C: EFECTO DE LA QUERCETINA.

---

**Nombre del congreso:** XXXVIII Congreso Anual de la Asociación Española para el Estudio del Hígado

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2013

**Lugar:** Madrid

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XIX. **Título de la aportación:** Modulación de la vía PI3K/AKT/MTOR y la replicación del virus de la hepatitis C en un sistema in vitro. Papel de los microARNs.

**Nombre del congreso:** XXXVIII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH).

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2013

**Lugar:** - MADRID, ESPAÑA

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Romero-Gómez, Manuel; Campo-Castillo, José Antonio del.

XX. **Título de la aportación:** PNPLA3 and DISC1 are associated with steatosis in patients with chronic Hepatitis C.

**Nombre del congreso:** The 63rd Annual Meeting of The American Association for the study of the liver disease.

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2012

**Lugar:** BOSTON - MASSACHUSETTS; ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

**Autores:** Ampuero-Herrojo, Javier; Campo-Castillo, José Antonio del; Rojas, Lourdes. ; Maraver, Marta; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Romero-Gómez, Manuel.

XXI. **Título de la aportación:** Interaction between host and viral genotypes influenced Hepatitis C infection.

**Nombre del congreso:** The 63rd Annual Meeting of The American Association for the study of the liver disease.

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2012

**Lugar:** BOSTON - MASSACHUSETTS; ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

---

**Autores:** ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Campo-Castillo, José Antonio del; Ampuero-Herrojo, Javier; Maraver-Zamora, Marta; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; MILLAN-DOMINGUEZ, RAQUEL; Romero-Gómez, Manuel.

XXII. **Título de la aportación:** miRNAs involved in insulin resistance are regulated in vitro by HCV infection.

**Nombre del congreso:** The 63rd Annual Meeting of The American Association for the study of the liver disease.

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2012

**Lugar:** BOSTON - MASSACHUSETTS; ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Romero-Gómez, Manuel; Campo-Castillo, José Antonio del.

XXIII. **Título de la aportación:** Interacción entre los genotipos virales y del hospedador influenciados por la infección del virus de la Hepatitis C.

**Nombre del congreso:** XLIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Autonómico

**Año:** 2012

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Campo-Castillo, José Antonio del; Ampuero-Herrojo, Javier; Ortiz-Fernández, Lourdes; Maraver-Zamora, Marta; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Conde, Marta; García-Valdecasas-Merino, Marta María; García-Lozano, José Raul; Andrade-Bellido, Raúl J.; Salmerón-Escobar, Francisco Javier; Navarro-Jarabo, José María; MILLAN-DOMINGUEZ, RAQUEL; González-Escribano, María Francisca; Romero-Gómez, Manuel.

XXIV. **Título de la aportación:** PNPLA3 y DISC1 están asociados con esteatosis en pacientes con Hepatitis crónica C.

**Nombre del congreso:** XLIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Autonómico

**Año:** 2012

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** Ampuero-Herrojo, Javier; Campo-Castillo, José Antonio del; ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Ortiz-Fernández, Lourdes; Maraver-Zamora, Marta; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Conde, Marta; García-Valdecasas-Merino, Marta María; García-Lozano, José Raúl; Solá, Ricardo; Fons, Xavier; Andrade-Bellido, Raúl J.; Salmerón-Escobar, Francisco Javier; Navarro-Jarabo, José María; MILLAN-DOMINGUEZ, RAQUEL; González-Escribano, María Francisca; Romero-Gómez, Manuel.

---

XXV. **Título de la aportación:** LA MODULACIÓN IN VITRO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA AFECTA A LA REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

**Nombre del congreso:** XLIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Autonómico

**Año:** 2012

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XXVI. **Título de la aportación:** ANÁLISIS IN VITRO DE LAS ALTERACIONES METABÓLICAS PROMOVIDAS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO.

**Nombre del congreso:** XLIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Autonómico

**Año:** 2012

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** Campo-Castillo, José Antonio del; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Romero-Gómez, Manuel.

XXVII. **Título de la aportación:** LA QUERCETINA INHIBE LA REPLICACIÓN VIRAL Y MODULA EL METABOLISMO LIPÍDICO.

**Nombre del congreso:** XLIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Autonómico

**Año:** 2012

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XXVIII. **Título de la aportación:** HEPATITIS C VIRUS MODIFIES THE EXPRESSION OF MICRO-RNAs ASSOCIATED WITH APOPTOSIS AND METABOLIC SYNDROME IN HUH7.5 CELLS.

**Nombre del congreso:** 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver (EASL).

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2012

**Lugar:** Barcelona, España

**Autores:** ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

---

XXIX. **Título de la aportación:** HEPATITIS C VIRUS MODULATES LDL RECEPTOR (LDLR) GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS ACCORDING TO VIRAL CLEARANCE.

**Nombre del congreso:** 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver (EASL).

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2012

**Lugar:** Barcelona, España

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Eslam, Mohammed; Romero-Gómez, Manuel.

XXX. **Título de la aportación:** HEPATITIS C VIRUS MODIFIES PROTEIN AND GENE EXPRESSION OF THE INSULIN SIGNALING PATHWAY IN VIVO AND IN VITRO.

**Nombre del congreso:** 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver (EASL).

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2012

**Lugar:** Barcelona, España

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XXXI. **Título de la aportación:** FACTORES IMPLICADOS EN LA AUSENCIA DE RESPUESTA EN PACIENTES CON GENOTIPO FAVORABLE DE LA IL28B EN HEPATITIS C.

**Nombre del congreso:** XXXVII CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO (AEEH)

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2012

**Lugar:** - MADRID, ESPAÑA

**Autores:** Maraver-Zamora, Marta; ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Andrade-Bellido, Raúl J.; Salmerón-Escobar, Francisco Javier; Navarro-Jarabo, José María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; CANO-MEDEL, CRISTINA; Millán, Marina; MILLAN-DOMINGUEZ, RAQUEL; Romero-Gómez, Manuel.

XXXII. **Título de la aportación:** LOS TRATAMIENTOS CONTRA LA RESISTENCIA A LA INSULINA INHIBEN LA REPLICACION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN UN SISTEMA IN VITRO

**Nombre del congreso:** XXXVII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Nacional

---

**Año:** 2012

**Lugar:** - MADRID, ESPAÑA

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XXXIII. **Título de la aportación:** EL VIRUS DE LA HHEPATITIS C MODULA IN VIVO E IN VITRO LA EXPRESIÓN DE GENES Y PROTEÍNAS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

**Nombre del congreso:** XXXVII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2012

**Lugar:** - MADRID, ESPAÑA

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XXXIV. **Título de la aportación:** EL VIRUS DE LA HEPATITIS C MODULA LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RLDL EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

**Nombre del congreso:** XXXVII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH).

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2012

**Lugar:** - MADRID, ESPAÑA

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Ranchal, Isidora; Romero-Gómez, Manuel; Campo-Castillo, José Antonio del.

XXXV. **Título de la aportación:** TÉCNICAS ESTADÍSTICAS EN EL PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA FIBROSIS EN NAFLD.

**Nombre del congreso:** XXXVII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH).

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2012

**Lugar:** MADRID, ESPAÑA

**Autores:** Aranda-guerrero, E; Ramírez-Martínez, D; Gómez-González, E; Aparcero-López, Reyes; ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Moreno, I; Fernández-arguelles, A; Gallego-Durán, Rocío; Romero-Gómez, Manuel; García-Valdecasas-Merino, Marta María.

XXXVI. **Título de la aportación:** INTERACCION ENTRE EL POLIMORFISMO DE RS12978960 DEL GEN DE LA IL28B CON LOS FACTORES BASALES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO



---

DE LA HEPATITIS C.

**Nombre del congreso:** XXXVII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH).

**Tipo de evento:** Póster en congreso.

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2012

**Lugar:** MADRID, ESPAÑA

**Autores:** Maraver-Zamora, Marta; ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Andrade-Bellido, Raúl J.; Salmerón-Escobar, Francisco Javier; Navarro-Jarabo, José María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; CANO-MEDEL, CRISTINA; MILLAN-DOMINGUEZ, RAQUEL; Romero-Gómez, Manuel.

XXXVII. **Título de la aportación:** EL VIRUS DE LA HEPATITIS C MODIFICA LA EXPRESIÓN DE LOS MICR-RNAS RELACIONADOS CON APOPTOSIS Y SINDROME METABÓLICO.

**Nombre del congreso:** XXXVII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH).

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso.

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2012

**Lugar:** MADRID, ESPAÑA

**Autores:** ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XXXVIII. **Título de la aportación:** LA RESISTENCIA A LA INSULINA PREDICE LA RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA INDEPENDIEMENTE DEL POLIMORFISMO RS129798960 DE LA IL28B EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA C.

**Nombre del congreso:** XXXVII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH).

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2012

**Lugar:** - MADRID, ESPAÑA

**Autores:** ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Conde, Marta; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Maraver-Zamora, Marta; García-Lozano, Javier; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XXXIX. **Título de la aportación:** Proteomic analysis of hepatitis c infection in an in vitro model reveals a potencial new therapeutic target: TCTP (transcription controlled tumor protein).

**Nombre del congreso:** AASLD The Liver Meeting® 2011

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2011

---

**Lugar:** SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, EE.UU.

**Autores:** Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Romero-Gómez, Manuel.

XL. **Título de la aportación:** Metformin and rapamycin interact with insuling pathway and inhibit HCV replication in vitro

**Nombre del congreso:** AASLD The Liver Meeting® 2011

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2011

**Lugar:** SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS

**Autores:** Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Cuaresma-Duque, María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Romero-Gómez, Manuel.

XLI. **Título de la aportación:** Insulin reisistance predicts sustained virological response independently to IL28B RS12979860 polymorphism in trated patients with chronic hepatitis C.

**Nombre del congreso:** AASLD The Liver Meeting® 2011

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2011

**Lugar:** SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS

**Autores:** Rojas, Lourdes; Campo-Castillo, José Antonio del; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Cuaresma-Duque, María; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Maraver-Zamora, Marta; MILLAN-DOMINGUEZ, RAQUEL; Romero-Gómez, Manuel.

XLII. **Titulo de la aportación:** Role of rapamycin as mitor inhibitor in vitro and it use in the treatment of recurrent hepatitis C after liver transplantation.

**Nombre del congreso:** 46 Annual meeting of the European Association of the Study of the Liver

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Internacional

**Año:** 2011

**Lugar:** BERLIN, ALEMANIA

**Autores:** Campo-Castillo, José Antonio del; Bonnel, A; Cuaresma, María; Shaked, O; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Rajender-reddy, K; Romero-Gómez, Manuel.

XLIII. **Título de la aportación:** El virus de la hepatitis c modula en un sistema in vitro la expresión de los genes de la vía de señalización de la insulina.

**Nombre del congreso:** REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA.

**Tipo de evento:** Comunicación en congreso

**Ámbito:** Autonómico

**Año:** 2011

---

**Lugar:** JAEN, ESPAÑA

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XLIV. **Título de la aportación:** El análisis proteómico de la infección por hepatitis cen un modelo in vitro revela una nueva posible diana terapéutica: TCTP (Transcription Controlled Tumor Protein).

**Nombre del congreso:** Semana de las enfermedades digestivas.

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2011

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Romero-Gómez, Manuel.

XLV. **Título de la aportación:** El virus de la Hepatitis C modula en un sistema in vitro la expresión de genes de la vía de señalización de la insulina.

**Nombre del congreso:** Semana de las enfermedades digestivas.

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2011

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Romero-Gómez, Manuel.

XLVI. **Título de la aportación:** Tratamiento de la resistencia a la insulina con metformina de maner secuencial al peginterferon y ribavirina en la Hepatitis C crónica. Análisis en un sistema "in vitro".

**Nombre del congreso:** Semana de las enfermedades digestivas

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2011

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** Cuaresma-Duque, María; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Hoyas-Pablos, Elena; Aparcero-López, Reyes; Romero -Gómez, Manuel.

XLVII. **Título de la aportación:** Papel de la rapamicina como inhibidor de mTOR IN VITRO y su utilidad en el tratamiento de la Hepatitis C recurrente tras el trasplante hepático.

**Nombre del congreso:** Semana de las enfermedades digestivas

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2011

---

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** ROJAS-ÁLVAREZ-OSSORIO, LOURDES; Campo-Castillo, José Antonio del; Cuaresma-Duque, María; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Romero-Gómez, Manuel.

XLVIII. **Título de la aportación:** La vía de señalización de la insulina se puede bloquear en células huh7.5 infectadas con JFH1 mediante la sobreexpresión de PTPB1.

**Nombre del congreso:** Semana de las enfermedades digestivas

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2011

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** Campo-Castillo, José Antonio del; Cuaresma-Duque, María; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; Romero-Gómez, Manuel.

XLIX. **Título de la aportación:** Meta-análisis de la IL-28B y la respuesta viral sostenida en pacientes con Hepatitis C crónica.

**Nombre del congreso:** Semana de las enfermedades digestivas.

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2011

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** Maraver-Zamora, Marta; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Hoyas-Pablos, Elena; Aparcero-López, Reyes; Romero-Gómez, Manuel.

L. **Título de la aportación:** Tratamientos de la resistencia a la insulina con metformina de manera secuencial al peginterferon y ribavirina en la Hepatitis C. Análisis en un sistema in vitro.

**Nombre del congreso:** Congreso anual de la asociación española para el estudio del hígado.

**Tipo de evento:** Póster en congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2011

**Lugar:** Sevilla, España

**Autores:** Cuaresma-Duque, María; Campo-Castillo, José Antonio del; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Hoyas-Pablos, Elena; Aparcero-López, Reyes; Romero-Gómez, Manuel.

LI. **Título de la aportación:** La infección por virus C de las células huh7.5 modifica la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico.

**Nombre del congreso:** Semana de las enfermedades digestivas.

**Tipo de evento:** Póster en Congreso

**Ámbito:** Nacional

**Año:** 2011

**Lugar:** Sevilla, España

---

**Autores:** Rojas-Álvarez-Ossorio, M<sup>a</sup> de los Ángeles; García-Valdecasas-Merino, Marta María; Campo-Castillo, José Antonio del; Cuaresma-Duque, María; Romero-Gómez, Manuel.

