

Departamento de Ciencias Biomédicas

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PATOGÉNICOS DE LA HEPATITIS C Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE ESTEATOSIS. EFECTO DE UN TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE CON FLAVONOIDES



Memoria presentada por la Licenciada en Biología Sandra Pisonero Vaquero para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de León

León, 2014



INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La Dra. Dña. María Victoria García Mediavilla y la Dra. Dña. Sonia Sánchez Campos, como directoras de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de los mecanismos patogénicos de la hepatitis C y su relación con el desarrollo de esteatosis. Efecto de un tratamiento antioxidante con flavonoides" realizada por Dña. Sandra Pisonero Vaquero, en el programa de doctorado Biomedicina, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firman, en León a _____ de ____ de 2014.

Las directoras de la Tesis Doctoral,

Fdo.: Dra. Mª Victoria García Mediavilla

Fdo.: Dra. Sonia Sánchez Campos



ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

El órgano responsable del programa de doctorado Biomedicina en su reunión celebrada el día _____ de _____ de 2014 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "Estudio de los mecanismos patogénicos de la hepatitis C y su relación con el desarrollo de esteatosis. Efecto de un tratamiento antioxidante con flavonoides", dirigida por las Dras. Dña. María Victoria García Mediavilla y Dña. Sonia Sánchez Campos, elaborada por Dña. Sandra Pisonero Vaquero y cuyo título en inglés es el siguiente: "Study of the mechanisms involved in the development of steatosis associated to hepatitis C. Effects of antioxidant treatment with flavonoids".

Lo que firmo, en León a ____ de _____ de 2014.

La Secretaria,

Fdo.: Dra. Mar Almar Galiana

Vº B⁰

La Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.: Dra. Mª Jesús Tuñón González

Todos los resultados expuestos en la presente memoria, así como otros originados durante el periodo de realización de la Tesis Doctoral, han sido objeto de las siguientes publicaciones:

Modulation of PI3K-LXRα-dependent lipogenesis mediated by oxidative/nitrosative stress contributes to inhibition of hepatitis C virus replication by quercetin.

<u>Pisonero-Vaquero S</u>, García-Mediavilla MV, Jorquera F, Majano PL, Benet M, Jover R, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

Laboratory Investigation 94(3):262-74, 2014, 2014

The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPARα; and repressed by C/EBPα: Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. Guzmán C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, García-Mediavilla MV, Martínez-Chantar ML, González-Gallego J, Castell JV, Sánchez-Campos S, Jover R.

Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids 1831(4):803-18, 2013

Liver X receptor α -mediated regulation of lipogenesis by core and NS5A proteins contributes to HCV-induced liver steatosis and HCV replication.

García-Mediavilla MV, <u>Pisonero-Vaquero S</u>, Lima-Cabello E, Benedicto I, Majano PL, Jorquera F, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

Laboratory Investigation 92(8):1191-202, 2012

Parte de los resultados expuestos en la presente memoria han sido objeto de las siguientes comunicaciones a congresos:

La quercetina inhibe la replicación del VHC modulando la lipogénesis dependiente de PI3K-LXRα mediada por estrés oxidativo/nitrosativo en un modelo in vitro. Póster

<u>Pisonero-Vaquero S</u>, García-Mediavilla MV, Jorquera F, Majano PL, Benet M, Jover R, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

Gastroenterología y Hepatología, 36(1), 49, 2013

XXXVIII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) Madrid, España. 20-22 Feb, 2013

Modulation of PI3K-LXRα-dependent lipogenesis mediated by oxidative/nitrosative stress contributes to inhibition of hepatitis C virus replication by quercetin. Póster

<u>Pisonero-Vaquero S</u>, García-Mediavilla MV, Jorquera F, Majano PL, Benet M, Jover R, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

VI Jornadas Científicas del CIBERehd Barcelona, España. 29-30 Oct, 2012

Liver X Receptor α-mediated lipogenesis induced by hepatitis C virus NS5A and core proteins regulates viral replication in an in vitro model. Póster

<u>Pisonero-Vaquero S</u>, García-Mediavilla MV, Jorquera F, Majano PL, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

Journal of Hepatology, (56), S338. 2012

47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Barcelona, España. 18-22 Abr, 2012

La lipogénesis mediada por LXRα inducida por las proteínas NS5A y core del virus de la Hepatitis C regula la replicación vírica en un modelo *in vitro*. Póster

<u>Pisonero-Vaquero S</u>, García-Mediavilla MV, Jorquera F, Majano PL, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

Gastroenterología y Hepatología, 35(1), 177, 2012

XXXVII Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) Madrid, España. 15-17 Feb, 2012 Liver X receptor α-mediated lipogenesis induced by hepatitis C virus NS5A and core proteins regulates viral replication in an *in vitro* model. Póster

García-Mediavilla MV, <u>Pisonero-Vaquero S</u>, Jorquera F, Majano PL, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

V Jornadas Científicas del CIBERehd Barcelona, España. 22-23 Nov, 2011

Effect of HCV NS5A and core proteins and viral replication on LXRα-mediated lipogenic genes induction in an *in vitro* model. Póster

Lima-Cabello E, García-Mediavilla MV, <u>Pisonero-Vaquero S</u>, Jorquera F, Majano PL, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

Journal of Hepatology, (54), S323. 2011

46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Berlín, Alemania. 30 Mar-3 Abr, 2011

Efecto de las proteínas NS5A y core y de la replicación del VHC sobre la expresión de los principales genes lipogénicos dependientes de LXRα en modelos *in vitro* de hepatitis C. Póster Lima-Cabello E, García-Mediavilla MV, <u>Pisonero-Vaquero S</u>, Jorquera F, Olcoz JL, Majano PL, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

Gastroenterología y Hepatología, 34(1), 151, 2011

XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) Madrid, España. 23-25 Feb, 2011

Effect of HCV NS5A and core proteins and viral replication on LXRα-mediated lipogenic genes induction in an *in vitro* model. Póster

García-Mediavilla MV, Lima-Cabello E, <u>Pisonero-Vaquero S</u>, Jorquera F, Majano PL, González-Gallego J, Sánchez-Campos S. IV Jornadas Científicas del CIBERehd

Barcelona, España. 25-26 Nov, 2010

Role of LXRα and its lipogenic target genes in the pathogenesis of HCV-related steatosis in an *in vitro* model. Póster

García-Mediavilla MV, Lima-Cabello E, <u>Pisonero-Vaquero S</u>, Merino-Antolín B, Majano PL, Benedicto I, Olcoz JL, González-Gallego J, Sánchez-Campos S. Journal of Hepatology, (52), S305-S306. 2010 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Viena, Austria. 14-18 Abr, 2010

Estudio de la expresión génica de LXR α y de los principales genes lipogénicos relacionados con el desarrollo de esteatosis en modelos *in vitro* de hepatitis C. Póster

García-Mediavilla MV, Lima-Cabello E, <u>Pisonero-Vaquero S</u>, Merino-Antolín B, Majano PL, Benedicto I, González-Gallego J, Sánchez-Campos S.

Gastroenterología y Hepatología, 33(1), 117, 2010

XXXV Congreso Nacional de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH) Madrid, España. 17-19 Feb, 2010

Financiación

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, Sandra Pisonero Vaquero ha sido beneficiaria de una ayuda del Ministerio de Educación para la Formación de Profesorado Universitario (FPU, AP2009-4484) del Programa Nacional de Formación de Recursos Humanos de Investigación, en el marco del Plan Nacional de I+D+I (2008-2011), conducente a la formación docente e investigadora en el marco del Estatuto del personal investigador en formación así como, hasta la obtención de dicha financiación, de una ayuda destinada a financiar la contratación de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria, en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo, Tecnológico e Innovación 2007-2013 (Consejería de Educación, Junta de Castilla y León), cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

Además, la presente Tesis Doctoral se enmarca dentro del Proyecto: "Papel del receptor nuclear LXRα y de los principales genes lipogénicos e inflamatorios en el desarrollo y evolución de esteatosis en modelos *in vitro* de hepatitis C. Efecto de un tratamiento con quercetina". Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Educación y Ciencia, Programa de Biología Fundamental. 2010-2012 (BFU2010-15784/BFI).

"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa"

Mahatma Gandhi

A mi familia

"Cuál gran riqueza, aún para alguien pobre, tener unos buenos padres"

Agradecimientos

Después de todos estos años, quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra han contribuido a hacer posible la realización de la presente Tesis Doctoral y que, después de compartir tantas horas juntos, llegan a ser como una segunda familia.

En primer lugar a mis directoras, Sonia y Vicky, por confiar en mí, por todo lo que me han enseñado, por su comprensión en cada momento, y por ser siempre algo más que sólo unas directoras.

A Javier, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, porque sin él no habría sido posible la realización de mi Tesis y por ayudarme en todo lo que he necesitado, en especial con mis frustradas estancias al extranjero.

A Ramiro, Carla, Marta B. y Marta M., por acogerme tan bien en Valencia e introducirme en ese mundo de los adenovirus y de "esa cosa" llamada *ChIP*.

A todos los chicos de prácticas, de trabajos de fin de máster y grado que me han tenido que aguantar, Silvia, Bea, Patri, Leti... y en especial a Aitor y Ángel, por su entusiasmo, su interés y todo su apoyo.

A Bea e Irene por aguantar mis "gruñidines", pero también por tantas risas y por intentar responder a todas esas dudas que sólo yo tengo; a Javichín, por dedicar parte de su tiempo a explicarme sus protocolos; a Daniela, por esa alegría que contagia; a Raquel y Anna, por esas reflexiones conjuntas a última hora de la tarde; y a Susana, por hacer más fácil el trabajo en el Instituto.

A Raqueee, por compartir más horas fuera que dentro del *lab* que vienen tan bien...Cómo no, a mi Paulis, por ser esa hormiguita trabajadora que ha estado siempre ahí para mí y siempre con una sonrisa en la cara, y por ser la única persona que ha conseguido hacerme hablar un poquito en inglés...Y a mi Sariii, por inundar de alegría el despacho, por esos cafés al sol para cargar las pilas, por sus empujones cuando los he necesitado, por tan buenos momentos dentro y fuera del *lab* y por seguir tan cerca a 9.000 km de distancia.

A María José, Ludy, Héctor y toda la demás gente del IBIOMED y del Departamento de Fisiología, por poder disponer de su ayuda siempre que la he necesitado; y en especial a José Luis, de quien recibí una llamada un buen día y no se cómo me lió que hoy estoy escribiendo los agradecimientos de una Tesis Doctoral.

Y por supuesto, quiero mostrar mi agradecimiento a mis amigos y sobre todo a mi familia, por su apoyo incondicional, por su ánimo en los momentos más difíciles y por haber valorado tanto siempre lo que hago.

A todos,

Gracias

Abreviaturas y símbolos

ABC	ATP(adenosín trifosfato)- <i>binding casette</i>
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AGL	Ácidos grasos libres
АКТ	Proteína guinasa B
AML-12	Alpha mouse liver 12
АМРК	Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
ANOVA	Test de análisis de varianza
AOX	Acil-CoA oxidasa
аро	Apolipoproteína
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF6	Factor de transcripción activador 6
CD81	Clúster de diferenciación 81
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
CLDN1	Claudina-1
CMV	Citomegalovirus
COX-2	Ciclooxigenasa-2
СРТ	Carnitina palmitoil transferasa
СҮР	Citocromo P450
DAAs	Agentes que actúan directamente sobre el virus
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGAT	Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa
DHE	Dihidroetidio
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DR-4	Repetición directa con separador de 4 nucleótidos
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media

elF	Factor de iniciación de la traducción en eucariotas
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplasmático
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ERSEs	Elementos de respuesta a estrés del retículo endoplasmático
ETH	Etidio
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
FAT/CD36	Translocasa de ácidos grasos CD36
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FXR	Receptor X farnesoide
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
HSP	Proteína de choque térmico
IFN	Interferón
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
Insig	Gen inducido por insulina
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
IRE1	Enzima 1 que requiere inositol
LCAD	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LXR	Receptor X del hígado
LXRE	Elemento de respuesta a LXR
MC4R	Receptor 4 de melanocortina
MCAD	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media
MCD	Deficiente en metionina y colina
miARN	Micro ARN
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
MTP	Proteína microsomal de transporte de triglicéridos
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no alcohólica

NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NF-κB	Factor nuclear kappa B
OCLN	Ocludina
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERK	Proteína quinasa del retículo endoplasmático
PGC-1α	Co-activador 1 de PPARγ
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
РІЗК	Fosfoinositol 3 quinasa
РКА	Proteína quinasa A
PPAR	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
pre-miARNs	Micro ARNs precursores
pri-miARNs	Micro ARNs primarios
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
RT-qPCR	Transcripción reversa-PCR cuantitativa a tiempo real
RVS	Respuesta virológica sostenida
RXR	Receptor X retinoide
SCAP	Proteína activadora de la escisión de SREBP
SCD	Estearoil-CoA desaturasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
siRNA	ARN pequeño de interferencia
SR-BI	Receptor scavenger clase B tipo I
SRE	Elemento regulador de esteroles
SREBP	Proteína de unión al elemento regulador de esteroles
TEMED	Tetrametiletilendiamida
TG	Triglicéridos
ΤΝFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TZD	Tiazolidinediona
UPREs	Elementos de respuesta a proteínas desplegadas
UTR	Región no traducida
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLCAD	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
XBP1	Proteína 1 de unión a la caja X

Índice de contenidos

Lista de figuras	V
Lista de tablas	
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	9
ANTECEDENTES	7
2.1. Hepatitis C	9
2.1.1. Introducción	9
2.1.2. Prevalencia	10
2.1.3. Transmisión	10
2.1.4. El virus de la hepatitis C	11
2.1.4.1. Genoma	11
2.1.4.2. Entrada del virus	13
2.1.4.3. Replicación y traducción	
2.1.4.4. Ensamblaje viral y liberación	
2.1.4.5. Genotipos	15
2.1.4.6. Recombinación	
2.1.5. Patogénesis de la enfermedad	
2.1.5.1. Estrés del retículo y respuesta a proteínas desplegadas (UPR)	
2.1.5.2. Autofagia	
2.1.5.3. Apoptosis	19
2.1.5.4. Detención del ciclo celular y señalización mitogénica de daño e Vía de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K)	n el ADN. 19
2.1.5.5. Disfunción mitocondrial	20
2.1.5.6. Respuesta inmune e inflamación	21
2.1.5.7. Metabolismo lipídico	22
2.1.5.8. Papel de los miARNs	
2.1.6. Diagnóstico de la infección con VHC	
2.1.7. Tratamiento	27
2.1.8. Modelos de estudio <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la hepatitis C	
2.2. Esteatosis	
2.2.1. Introducción	32
2.2.2 Patogénesis e histopatología	
2.2.3. Regulación del metabolismo lipídico	
2.2.3.1. Lipogénesis <i>de novo</i>	

2.2.3.2. Captación y transporte4	1
2.2.3.3. Vías de oxidación de ácidos grasos4	2
2.2.3.4. Secreción de triglicéridos4	3
2.2.3.5. Papel de los miARNs4	4
2.2.4. Hepatitis C y esteatosis4	5
2.2.5. Diagnóstico	6
2.2.6. Tratamiento 4	7
2.2.7. Modelos de estudio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la esteatosis5	1
2.3. Flavonoides	4
2.3.1. Introducción5	4
2.3.2. Quercetina	5
2.3.3. Flavonoides en el tratamiento de la hepatitis C5	7
2.3.4. Flavonoides en el tratamiento de la esteatosis5	9
MATERIALES Y MÉTODOS	1
3.1. Cultivos celulares 6	3
3.1.1. Líneas celulares6	3
3.1.2. Condiciones de cultivo6	4
3.2. Tratamientos	4
3.2.1. Silenciamiento de LXRα mediante <i>siRNA</i> 6	4
3.2.2. Inducción de LXRα mediante el agonista GW39656	5
3.2.3. Inhibición de la fosforilación de AKT6	5
3.2.4. Tratamiento con flavonoides e IFNα-2b6	5
3.2.5. Inducción de la expresión de LXR $lpha$ mediante vectores adenovirales	6
3.3. Determinaciones analíticas 6	7
3.3.1. Viabilidad celular6	7
3.3.2. Cuantificación de triglicéridos6	7
3.3.3. Cuantificación de ácidos grasos libres6	9
3.3.4. Citometría de flujo7	0
3.3.5. Microscopía de fluorescencia7	1
3.3.6. Extracción de ARN7	2
3.3.7. Cuantificación de ARN7	2
3.3.8. Tratamiento con ADNasas	3
3.3.9. Reacción de la Transcriptasa Reversa7	3
3.3.10. PCR cuantitativa a tiempo real	4
3.3.11. Ensayo de inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP assay) 7	7
3.3.12. Obtención del homogeneizado proteico8	3

	3.3.13. Cuantificación de proteína
	3.3.14. Western Blot 84
	3.3.15. Co-Inmunoprecipitación
	3.4. Análisis estadístico
R	ESULTADOS
	4.1. Las proteínas NS5A y core regulan la lipogénesis mediada por LXRα contribuyendo al desarrollo de esteatosis hepática y a la replicación del VHC91
	4.1.1. La expresión de las proteínas core y NS5A, así como la replicación del VHC, inducen la acumulación intracelular de lípidos91
	4.1.2. La expresión de las proteínas core y NS5A y la replicación del VHC inducen la expresión génica de LXRα y de genes lipogénicos relacionados
	4.1.3. La sobreexpresión de los genes lipogénicos inducida por las proteínas NS5A y core y por la replicación del VHC está mediada por LXRα
	4.1.4. LXRα y las proteínas core y NS5A no colocalizan en las células VHC-G1 96
	4.1.5. La inhibición de la vía PI3K/AKT atenúa la sobreexpresión de LXRα mediada por la expresión de las proteínas core y NS5A y por la replicación del VHC98
	4.1.6. La modulación de la expresión de LXRα regula la expresión de los genes lipogénicos y la replicación del VHC en las células VHC-G1
	4.2. La quercetina modula la lipogénesis dependiente de PI3K-LXRα mediada por estrés oxidativo/nitrosativo, contribuyendo a la inhibición de la replicación del VHC
	4.2.1. La quercetina es el flavonoide más efectivo en la inhibición de la replicación del VHC
	4.2.2. La quercetina inhibe el estrés oxidativo y nitrosativo en las células VHC-G1
	4.2.3. La quercetina disminuye la acumulación intracitoplasmática de lípidos inducida por el VHC
	4.2.4. La quercetina disminuye la sobreexpresión de los génes lipogénicos asociada a la replicación del VHC112
	4.2.5. La quercetina reduce la sobreexpresión de LXRα inducida mediante infección adenoviral
	4.2.6. La vía PI3K/AKT está implicada en el efecto inhibidor de la quercetina sobre la lipogénesis mediada por LXRα en células VHC-G1
D	ISCUSIÓN
С	ONCLUSIONES
В	IBLIOGRAFÍA

Lista de figuras

Figura 1. Prevalencia mundial de la hepatitis C en el año 2010 (%)
Figura 2. Genoma del VHC 12
Figura 3. Transición de la conformación cerrada a la abierta de la región que comprende al IRES
Figura 4. Entrada del VHC en la célula hospedadora13
Figura 5. Estrés del retículo y respuesta a proteínas desplegadas
Figura 6. Proceso de formación de miARNs
Figura 7. Factores que contribuyen al desarrollo de esteatosis
Figura 8. (A) Esqueleto 3-hidroxiflavona con localizaciones numeradas para la unión de grupos glicosil e hidroxil. (B) Estructura química de la quercetina
Figura 9. Representación esquemática del protocolo llevado a cabo para la realización del ensayo ChIP
Figura 10. Efecto de las proteínas NS5A y core y de la replicación del VHC en el acúmulo lipídico intracelular
Figura 11. Sobreexpresión de LXRα, SREBP-1c, PPARγ y FAS en las células CHL-NS5A, CHL-core y VHC-G1
Figura 12. Las proteínas core y NS5A y la replicación del VHC potencian la unión de LXRα y de SREBP-1c a su elemento de respuesta correspondiente en los promotores de SREBP-1c y FAS
Figura 13. Ausencia de asociación física entre LXRα y las proteínas core y NS5A en las células VHC-G1
Figura 14. Efecto de la inhibición de la vía PI3K/AKT sobre la sobreexpresión de LXRα mediada por las proteínas core y NS5A del VHC y por la replicación viral
Figura 15. Efecto del silenciamiento de LXRα y del tratamiento con un agonista del mismo sobre la expresión de los genes lipogénicos, la replicación del VHC y la expresión de sus proteínas en células VHC-G1
Figura 16. Estructura química de los flavonoles quercetina y kaempferol, la flavanona taxifolina y la flavona apigenina
Figura 17. Efecto de los diferentes flavonoides sobre la replicación del VHC en células VHC-G1
Figura 18. Efecto del tratamiento con quercetina y su combinación con IFN α sobre la replicación viral en células VHC-G1
Figura 19. Efecto del tratamiento con quercetina y su combinación con IFN α sobre la concentración de las proteínas NS5A y core en células VHC-G1
Figura 20. Efecto del tratamiento con quercetina y su combinación con IFN α sobre la viabilidad celular en células VHC-G1106
Figura 21. Efecto del tratamiento con quercetina o IFNα sobre la producción de EROs y ERNs en células VHC-G1107

Figuras 22. Efecto del tratamiento con quercetina o IFN α sobre la producción de anión superóxido y sobre la peroxidación lipídica en células VHC-G1
Figura 23. Efecto del tratamiento con quercetina o IFN α sobre la acumulación intracitoplasmática de lípidos en células VHC-G1111
Figura 24. Efecto del tratamiento con quercetina o IFNα sobre la expresión de FAS en células VHC-G1
Figura 25. Efecto del tratamiento con quercetina o IFNα sobre la expresión de LXRα en células VHC-G1113
Figura 26. Inducción de la sobreexpresión de LXR α mediante infección adenoviral 115
Figura 27 Efecto del tratamiento con guercatina o IENa sobre la sobreevoración de

Figura 27. Efecto del tratamiento con quercetina o IFNα sobre la sobreexpresión de LXRα y sobre la acumulación intracitoplasmática de lípidos en células Huh7 Ad-0,5....117

Figura 28. Efecto del tratamiento con quercetina o IFNα y LY294002 sobre la lipogénesis dependiente de LXRα mediada por la vía PI3K/AKT en células VHC-G1......119

Lista de tablas

Tabla 1. Primers y sondas utilizados en la qPCR para el estudio de los genes lipogénico	os.
	. 76
Tabla 2. Primers utilizados en la qPCR para el estudio de la replicación del VHC	. 77
Tabla 3. Primers de elección en la PCR para el ensayo ChIP	. 83

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa causada por el virus de la hepatitis C (VHC), agente identificado en 1989 como responsable de la mayoría de las hepatitis no-A no-B de origen postransfusionales (1). Se trata de un virus envuelto con un genoma ARN de cadena sencilla y polaridad positiva que codifica para 3 proteínas estructurales (core, E1 y E2) y siete proteínas no estructurales (p7, NS2-NS5B) (2). Actualmente, esta enfermedad es uno de los problemas de salud más graves, debido a la propagación del VHC en todo el mundo, a la existencia de varias vías de transmisión y a la falta de una terapia realmente eficiente (3).

El VHC posee la habilidad de activar varias respuestas celulares, incluyendo estrés del retículo endoplasmático, autofagia, apoptosis o detención del ciclo celular. Estas respuestas celulares pueden participar en el desarrollo de enfermedades hepáticas asociadas a la patogénesis del VHC, por ejemplo alterando el metabolismo lipídico o activando la vía de señalización oncogénica (4). Aproximadamente el 50% de los pacientes infectados con VHC tienen esteatosis (5), pudiendo evolucionar a esteatohepatitis y fibrosis e incluso progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (6).

La infección crónica con VHC está asociada a la desregulación de la homeostasis de lípidos, favoreciendo la acumulación de triglicéridos en el hígado mediante la activación transcripcional de genes lipogénicos (7, 8). Así, se ha demostrado que proteínas del VHC, como core y NS5A, aumentan la acumulación hepática de lípidos mediante la inducción de la activación de la proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroles (SREBP-1c) y el receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR) γ (9-11). Uno de los genes clave en el control del metabolismo lipídico es el receptor X del hígado (LXR) α . Los LXRs son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Además de regular el metabolismo de colesterol, LXRs regulan la biosíntesis hepática de ácidos grasos. Este proceso está controlado por SREBP-1c, cuya expresión está regulada por LXR α y que a su

3

vez modula todos los genes implicados en la vía de la lipogénesis *de novo* (12). La esteatosis hepática inducida por la activación de LXRα no sólo se debe a la estimulación de la síntesis de ácidos grasos, sino también al incremento de la captación de ácidos grasos libres, ya que la translocasa de ácidos grasos FAT/CD36 está también regulada por LXRα (13).

El tratamiento convencional para la hepatitis C crónica ha consistido hasta mayo de 2011 en la combinación de interferón α pegilado (pegIFN α) junto con ribavirina, permitiendo la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) posteriormente el uso de los primeros agentes que actúan directamente contra el virus C (boceprevir y telaprevir). La infección con el VHC es única en su dependencia y modificación del metabolismo lipídico del hospedador. De hecho, el acúmulo intrahepatocitario de lípidos inducido por el virus contribuye a una peor respuesta al tratamiento. Por ello, incluir terapias moduladoras del metabolismo lipídico junto con los agentes antivirales puede incrementar la efectividad del tratamiento (14). Se ha descrito la existencia de numerosos compuestos naturales que afectan al metabolismo lipídico y presentan actividad antiviral. Entre éstos se encuentra la guercetina, un componente perteneciente a la familia de los flavonoides, con actividad frente al VHC (15-17) y capaz de reducir la acumulación de grasa en el hígado, disminuyendo tanto el estrés oxidativo como la expresión de genes relacionados con el desarrollo de esteatosis (18).

Dado todo lo anteriormente expuesto, los objetivos planteados en la presente tesis doctoral son los siguientes:

<u>Objetivo general</u>

Profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos involucrados en el desarrollo y evolución de esteatosis asociada a hepatitis C en aspectos relacionados con la modulación del metabolismo lipogénico dependiente de LXR α , estableciendo el papel de las proteínas NS5A y core y de la

4

replicación del VHC en dicho proceso y valorando el efecto de un tratamiento experimental con el flavonoide quercetina sobre dichos mecanismos.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la expresión de las proteínas core y NS5A del virus de la hepatitis C, así como la replicación del mismo, en el acúmulo intrahepatocitario de lípidos y en la expresión génica de LXRα y su repercusión en la expresión de los genes lipogénicos regulados por él en nuestros modelos *in vitro* de hepatitis C.

2. Establecer los mecanismos moleculares involucrados en el efecto de las proteínas NS5A y core y la replicación del VHC sobre el acúmulo intracitoplasmático de lípidos y la expresión de LXRα y de los principales genes lipogénicos.

3. Estudiar el efecto de la modulación de la expresión de LXRα sobre la expresión génica de los principales genes lipogénicos y su repercusión en la eficiencia de replicación del virus de la hepatitis C y la expresión de sus proteínas NS5A y core.

4. Analizar el efecto de un tratamiento con los flavonoides kaempferol, apigenina, taxifolina y quercetina, a diferentes dosis, sobre la replicación del VHC. Determinar el efecto del tratamiento combinado con quercetina e IFNα-2b sobre la replicación del VHC y la expresión de sus proteínas NS5A y core en nuestro modelo *in vitro* de replicación.

5. Estudiar la contribución de la modulación del estrés oxidativo/nitrosativo y de la lipogénesis dependiente de LXR α en el efecto de la quercetina sobre la inhibición de la replicación del virus de la hepatitis C.

6. Analizar la implicación de la vía de señalización de la fosfoinositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT) en el efecto de la quercetina sobre la modulación de la lipogénesis mediada por LXRα y sobre la propia replicación del VHC en nuestro modelo *in vitro*.

5
ANTECEDENTES

2.1. Hepatitis C

2.1.1. Introducción

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa causada por el virus de la hepatitis C (VHC), virus hepatotropo con capacidad para causar inflamación y necrosis hepática (19). Este virus fue clonado en 1989 e identificado como responsable de la mayoría de las hepatitis no-A no-B de origen postransfusional (1). Actualmente, esta enfermedad es uno de los problemas de salud más graves, debido a la propagación del VHC en todo el mundo, a la existencia de varias vías de transmisión y a la falta de una terapia realmente eficiente (3).

Aunque la incidencia de nuevos casos es baja, muy pocos pacientes expuestos al virus lo eliminan, así que la mayoría de las exposiciones al virus resultan en una infección crónica que continuará indefinidamente. La mayoría de los pacientes infectados crónicamente no saben que han sido infectados por el virus, ya que la infección generalmente es asintomática (20). Diversos estudios muestran que el 80% de los casos de hepatitis C aguda progresan a infección crónica; el 10-20% de éstos desarrollarán complicaciones como cirrosis dentro de las dos o tres décadas desde su comienzo, y un 1-5% desarrollará cáncer de hígado (21).

El éxito del tratamiento para la hepatitis C está en alcanzar la respuesta virológica sostenida (RVS), la ausencia de detección del virus en la sangre seis meses después del final del tratamiento. Los pacientes que alcanzan una RVS tienen un riesgo mucho menor de padecer cirrosis y carcinoma hepatocelular. Sin embargo, el tratamiento actual con interferón pegilado y rivabirina en combinación con otros agentes antivirales no suele tener éxito, además de estar asociado con diversos efectos adversos, por lo que se espera que los tratamientos desarrollados recientemente para la infección con VHC incrementen significativamente la tasa de RVS (22).

9

2.1.2. Prevalencia

El virus de la hepatitis C tiene una distribución mundial, afectando a personas de cualquier edad, sexo, raza o región del mundo. Se estima que 130-170 millones de personas, o un 2-3% de la población mundial, están infectados con el virus de la hepatitis C. La prevalencia mundial de la hepatitis C se muestra en la Figura 1.

Se estima que hay unos 400.000 infectados de manera crónica en Australia y Oceanía, 14 millones en América, 16 millones en Oriente Medio, 28 millones en África y 83 millones en Asia (21). Aproximadamente 9 millones de personas en Europa están infectados con el VHC, aumentando la prevalencia en las regiones del este y del sur (23). Sólo en España, se calcula que hay alrededor de 800.000 personas infectadas (24). La prevalencia del VHC en la población de África varía entre el 0,1% y el 17,5% dependiendo del país. Los países con una mayor prevalencia son Egipto (17,5%), Camerún (13,8%) y Burundi (11,3%). Los países con menor prevalencia incluyen Zambia (0,2%), Kenia (0,9%), Malawi (0,7%) y Sudáfrica (0,1%) (25).



Figura 1. Prevalencia mundial de la hepatitis C en el año 2010 (%). Imagen modificada de Lavanchy, 2011 (21).

2.1.3. Transmisión

La principal vía de transmisión de la hepatitis C es parenteral, por exposición a sangre o hemoderivados contaminados, dándose la mayor tasa de infección entre drogodependientes por utilización de jeringuillas y agujas infectadas. La transmisión sexual o familiar parece ser menos efectiva que la transmisión por vía parenteral. También puede ocurrir una transmisión perinatal de madres infectadas a recién nacidos, aunque es infrecuente. Dicha transmisión ocurre sólo cuando las mujeres tienen una elevada viremia, incrementándose este riesgo cuando la madre está coinfectada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) debido al aumento de la carga de VHC como consecuencia de la inmunodepresión (19).

2.1.4. El virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C fue descubierto en 1989 (1). Se trata de un virus envuelto de unos 50 nm de diámetro (26), con un genoma ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, de 9.400 nucleótidos de longitud. Está clasificado dentro del género *Hepacivirus*, en la familia Flaviviridae (27) aunque la organización de su genoma difiere en muchos detalles de la organización del genoma de los miembros originales de la familia. El VHC tiene la peculiaridad de, a pesar de ser un virus ARN, ser capaz de establecer infecciones persistentes en la mayoría de los individuos expuestos (2).

2.1.4.1. Genoma

La mayoría de los genomas tienen un único marco de lectura abierto que codifica tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y siete proteínas no estructurales (p7, NS2-NS5B), tal y como se muestra en la Figura 2 (2). Además, se ha descrito la existencia de otro producto de la traducción, debido a la presencia de un marco de lectura alternativo (28).

Core es una proteína de unión a ARN que forma parte de la nucleocápsida y E1 y E2 son glicoproteínas que forman parte de la envoltura; p7 es una pequeña proteína de membrana con actividad como canal iónico y es necesaria para el ensamblaje y la liberación del virus; NS2 es una proteína transmembrana con actividad proteasa, que juega un papel importante en el ensamblaje y NS3 tiene una doble función como serina proteasa y ARN helicasa; NS4A forma un heterodímero estable con el dominio proteasa de NS3 y actúa como cofactor de éste; NS4B es una proteína transmembrana altamente hidrofóbica que parece inducir la formación de la red membranosa donde tiene lugar la replicación viral; NS5A es una metaloproteína que forma parte del complejo de replicación, importante también para el ensamblaje y NS5B es una ARN polimerasa ARNdependiente, componente catalítico de la maquinaria de replicación del virus (29-32).



Figura 2. Genoma del VHC. Imagen obtenida de Simmonds, 2004 (2).

La región no traducida (UTR) al final de cada genoma es necesaria para la replicación del mismo, proceso para el cual se demostró que era necesario un elemento de replicación activador en *cis* en la secuencia codificante de NS5B (33). La traducción de las proteínas virales es dependiente de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en 5' UTR que está constituido por un complejo elemento estructural de ARN que interacciona directamente con la subunidad 40S del ribosoma durante el inicio de la traducción (34). Se había propuesto que el IRES en el genoma del VHC estaba dentro de una conformación cerrada "C", entre los dominios II y IV, si bien según diversos estudios parece ser que esta región cambia a una estructura abierta "O", y este cambio es dirigido por un micro ARN (miARN) específico del hígado, el miR-122 (Figura 3). Esta transición estructural, observada *in vitro*, podría ser un mecanismo base que permitiera la traducción (35).





2.1.4.2. Entrada del virus

Las glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura del VHC median la mayoría de los procesos de entrada del virión, incluyendo la unión a la célula, la endocitosis y la fusión en el ambiente de bajo pH de endosomas tempranos (36-39).

El proceso de entrada a los hepatocitos humanos (Figura 4) requiere también de un gran número de proteínas del hospedador, tales como glicosaminoglicanos (GAGs) (39), el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) (40), el receptor *scavenger* clase B tipo I (SR-BI) (41), la tetraspanina CD81 (42) y dos proteínas de las uniones estrechas, la claudina-1 (CLDN1) y la ocludina (OCLN) (43).



Figura 4. Entrada del VHC en la célula hospedadora. Imagen modificada de Ploss y Evans, 2012 (44).

2.1.4.3. Replicación y traducción

Una vez producida la endocitosis, la partícula del VHC sufre la fusión de la membrana en el interior ácido del endosoma para liberar así su ARN al citoplasma (37). La molécula de ARN es traducida en el retículo endoplasmático rugoso dando lugar a una poliproteína de unos 3.000 aminoácidos de longitud, que es procesada posteriormente por proteasas celulares y virales para generar las 10 proteínas virales ya descritas.

El complejo de replicación del virus se localiza dentro de una red membranosa cuya formación es inducida por el propio virus (45). La replicación del ARN viral comienza con la formación de la cadena intermediaria de polaridad negativa para después generar a partir de ésta más genomas virales de polaridad positiva. Las nuevas cadenas de ARN de polaridad positiva formadas pueden además ser traducidas para producir nuevas proteínas virales, servir como moldes para la replicación del ARN, o bien ser incorporadas en el ensamblaje para la formación de los viriones infectivos.

Existen varios factores celulares implicados en el proceso de replicación, como la fosfatidil inositol 4 kinasa III α (PI4KIII α) (46) y la ciclofilina A, de manera que inhibidores de la ciclofilina muestran un efecto anti-VHC (47, 48).

2.1.4.4. Ensamblaje viral y liberación

El proceso de ensamblaje viral y liberación de viriones no se conoce completamente, aunque parece que está estrechamente ligado al metabolismo lipídico. La infección del VHC induce un profundo cambio en la distribución intracelular de las gotas lipídicas, produciéndose su acumulación, asociadas con proteínas y genoma virales, en la zona perinuclear frente a su distribución más generalizada por el citoplasma en células no infectadas (49). La asociación de la proteína core con las gotas lipídicas parece ser clave para el ensamblaje viral y, de hecho, el bloqueo de esta interacción interrumpe la producción de virus (50). Los viriones abandonan la célula mediante la vía de secreción, gracias a la implicación de varios cofactores de la célula hospedadora (51). Las partículas del VHC son transportadas mediante endosomas tempranos a endosomas tardíos hacia la membrana plasmática, donde la membrana del endosoma tardío se fusiona con la membrana plasmática para liberar los viriones al medio extracelular. Este mecanismo es independiente del empleado para la internalización de las partículas virales endocitadas durante el proceso de entrada del virus (52). Además, los viriones pueden ser transportados también hacia dominios de superficie celular especializados, como las uniones entre células. Así, se ha visto que la proteína CLDN1 es requerida para la propagación del virus de célula a célula (53).

2.1.4.5. Genotipos

Existen al menos siete grupos genéticos principales del VHC (genotipos 1 a 7) (54). Los genomas difieren en un 30-35 % de los sitios nucleotídicos, concentrándose dicha variabilidad en regiones como las glicoproteínas E1 y E2, mientras que otras regiones están más conservadas, como es el caso de la proteína core y la proteína no estructural NS3. La menor variabilidad se encuentra en la región 5' UTR debido a la importancia de las secuencias específicas y las estructuras secundarias de esta región en los procesos de replicación y traducción (2). Dentro de cada grupo existen a su vez diferentes subtipos (designados como a, b, c, etc.) que difieren unos de otros en un 20-25 % de la secuencia nucleotídica.

Algunos genotipos como el 1a, 1b y 3a se han distribuido ampliamente debido a la transmisión por medio de transfusiones de sangre y jeringuillas de drogodependientes y representan la mayoría de las infecciones de los países del Oeste. En África y el sureste de Asia se encuentra una asociación entre los genotipos y regiones geográficas específicas. Así, en el oeste de África predominan las infecciones por el genotipo 2 del VHC, mientras que en la región central predominan aquellas causadas por los genotipos 1 y 4 del VHC, existiendo en ambas zonas una gran diversidad de subtipos. En el sur y este de Asia los genotipos 3 y 6 muestran una diversidad genética similar (2).

2.1.4.6. Recombinación

El virus de la hepatitis C se caracteriza por poseer una gran heterogeneidad genética, lo cual influye de manera significativa en diversos aspectos como la persistencia viral, la susceptibilidad al tratamiento o la progresión de la enfermedad, entre otros (55). La principal causa de variación genética parece ser la mutación a nivel de nucleótidos.

Otro mecanismo que causa variación genética es la recombinación. Aunque dicho proceso suele ser importante en la mayoría de los virus ARN, hasta hace relativamente poco tiempo la evidencia de recombinación en el VHC era escasa (56), sugiriendo que es bastante infrecuente *in vivo* y que los recombinantes resultantes rara vez son viables (57). Sin embargo, en los últimos años se han identificado varias formas recombinantes del VHC, cambiando las ideas previas de ausencia de recombinación en este virus (58-60).

2.1.5. Patogénesis de la enfermedad

El VHC posee la habilidad de activar varias respuestas celulares, incluyendo estrés del retículo endoplasmático/respuesta a proteínas desplegadas, autofagia, apoptosis y detención del ciclo celular. Estas respuestas celulares pueden participar en el desarrollo de enfermedades hepáticas asociadas a la patogénesis del VHC, mediante la alteración del metabolismo lipídico, interfiriendo con el crecimiento y/o proliferación celulares y activando la vía de señalización oncogénica (4).

2.1.5.1. Estrés del retículo y respuesta a proteínas desplegadas (UPR)

La infección del VHC induce estrés del retículo endoplasmático e interfiere con la función del mismo en las células hospedadoras. Este orgánulo se encarga del plegamiento y modificación de proteínas. El desequilibrio entre la gran cantidad de proteínas acumuladas en el retículo endoplasmático y la limitada capacidad de plegamiento del mismo induce una respuesta de estrés, conocida como estrés del retículo endoplasmático. Cuando esto sucede la célula activa una única vía de señalización celular: la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) (61).

La Figura 5 muestra las tres clases de transductores de señal de esta respuesta: la proteína 1 que requiere inositol (IRE1), el factor de transcripción activador 6 (ATF6) y la quinasa del retículo endoplasmático (PERK). La activación de estos tres componentes produce la activación transcripcional de los genes con elementos de respuesta a estrés del retículo (ERSEs), así como de los genes que contienen elementos de respuesta a proteínas desplegadas (UPREs), incluyendo chaperonas, genes lipogénicos y genes relacionados con la degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD), produciéndose la supresión de la traducción global de proteínas y la activación de genes involucrados en el transporte de aminoácidos, la respuesta oxidativa y la muerte celular apoptótica (4).



Figura 5. Estrés del retículo y respuesta a proteínas desplegadas. Modificado de Ke y Chen, 2012 (4).

Diversos estudios sugieren que varias proteínas del VHC inducen estrés del retículo y activan la señalización de la respuesta a proteínas desplegadas para beneficiar la replicación viral y modular la síntesis y el plegamiento proteicos en las células infectadas (62-65).

2.1.5.2. Autofagia

La autofagia es un proceso intracelular que conduce los componentes citoplasmáticos mediante vacuolas de doble membrana hacia los lisosomas para su degradación, siendo esencial para la supervivencia, la diferenciación, el desarrollo y la homeostasis celular.

La activación de la autofagia se inicia con el secuestro de componentes citoplasmáticos dentro de una estructura membranosa denominada fagóforo, que se expande para formar un autofagosoma de doble membrana. Finalmente el autofagosoma se fusiona con un lisosoma, formando el autolisosoma donde el material engullido es degradado por proteasas lisosomales y reciclado para su uso por las células.

Bajo condiciones de privación de nutrientes, la autofagia es activada por represión de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), una proteína serina/treonina quinasa involucrada en la regulación del crecimiento celular y del metabolismo. Además de su papel en el mantenimiento de la homeostasis de nutrientes, la autofagia juega un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades como el cáncer y la infección microbiana (66).

Algunos miembros de la familia Flaviviridae, incluyendo el VHC, son capaces de inducir autofagia. Dicho proceso podría participar en la replicación viral. Asimismo, se ha demostrado que el VHC potencia la autofagia para regular la traducción del ARN viral (67) y es importante también para el proceso de ensamblaje y liberación de partículas virales (68).

2.1.5.3. Apoptosis

Una importante estrategia del hospedador para protegerse de la infección viral es desencadenar la muerte de la célula mediante el proceso de apoptosis (69). Dicho proceso está inducido a través de dos vías principales, la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca inducida por la familia TNF (factor de necrosis tumoral) (70, 71).

Varios estudios han demostrado que algunas proteínas virales, tal como core, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, pueden desencadenar el proceso de apoptosis (63, 72-77) así como tener funciones anti-apoptóticas, como es el caso de core, E2, NS2, NS3 y NS5A (78-82). Debido a esta controversia, si el VHC induce o antagoniza la apoptosis, dicho proceso debe ser estudiado en células que alberguen el ciclo de vida viral completo en lugar de sobreexpresar proteínas virales individuales. Por ello, estudios así llevados a cabo en conjunto sugieren que la infección del VHC podría conducir a la célula hospedadora a la muerte apoptótica mediante la alteración de la dinámica mitocondrial y potenciando la expresión de receptores de muerte asociados a TNF (83, 84).

2.1.5.4. Detención del ciclo celular y señalización mitogénica de daño en el ADN. Vía de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K)

La progresión del ciclo celular está estrechamente controlada por complejos de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), cuya actividad es regulada de manera positiva o negativa por ciclinas e inhibidores (CKIs) respectivamente. Inhibidores como p21 y p16 juegan un papel importante en la progresión del ciclo celular coordinando señales internas y externas e impidiendo la proliferación en determinados puntos de control del ciclo (*checkpoints*). Estos puntos de control en cada etapa aseguran la apropiada progresión del ciclo celular (85).

Las infecciones por virus conducen frecuentemente a la parada del ciclo celular mediante la alteración de la actividad de los reguladores del mismo (86). Está descrito que varias proteínas del VHC, como core y NS5B, podrían inducir la proliferación celular (87, 88). El VHC también está implicado en la respuesta al daño en el ADN, habiéndose observado que las proteínas NS2, NS3 y NS4A parecen inhibir dicha vía. Alterando la respuesta al daño en el ADN el VHC alteraría la señalización celular de la célula hospedadora en favor del crecimiento del virus (89, 90).

A menudo los virus promueven la supervivencia de las células infectadas para establecer así una infección crónica. Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) constituyen una vía de señalización que regula el crecimiento y la proliferación celulares en respuesta a un estímulo extracelular (91). El VHC puede interactuar tanto con esta vía como con la vía PI3K para controlar la señalización del crecimiento celular contribuyendo a la patogénesis causada por el VHC (92-94).

2.1.5.5. Disfunción mitocondrial

La mitocondria desempeña un papel central en la regulación de los flujos metabólicos y el estado energético de la célula. Como sensor del estado energético de la célula, la mitocondria decide sobre la muerte celular, el crecimiento, la proliferación y la diferenciación además de otra serie de procesos (95).

En conjunto, numerosos estudios sugieren que varias proteínas del VHC interactúan directamente con la mitocondria en los hepatocitos y alteran de manera significativa sus funciones en el metabolismo, equilibrio redox, eliminación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y apoptosis, lo que conlleva importantes consecuencias para la replicación viral y la patogénesis asociada a la hepatitis C crónica (75, 96-98).

La estrecha asociación entre el retículo endoplasmático y la mitocondria facilita la eficiente transmisión de Ca²⁺ desde el retículo hasta la mitocondria. Regular dicha liberación de Ca²⁺ por parte del retículo es un punto crítico para la homeostasis celular. Se requieren ciertas concentraciones de Ca²⁺ en el interior del orgánulo para estimular el metabolismo mediante la activación de varias enzimas necesarias para el mantenimiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Incrementos prolongados de Ca²⁺ pueden a su vez interferir con la actividad de estas enzimas.

Debido a que el potencial de membrana depende de la actividad de la cadena de transporte de electrones, la cual a su vez depende de la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la interferencia con alguno de estos procesos producirá un desequilibrio de sustratos que conducirá a la formación de EROs. Además, si la señalización de Ca²⁺ en la mitocondria sobrepasa cierto umbral, el potencial de membrana se colapsa y se desencadena la vía intrínseca de la apoptosis (99).

La captación de Ca²⁺ por la mitocondria podría ser la disfunción mitocondrial inicial inducida por el VHC que desencadenaría a su vez la pérdida del potencial de membrana y la generación de EROs (100). Las especies reactivas del oxígeno, a su vez, actúan como segundos mensajeros, y activan factores de transcripción como el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT-3) y el factor nuclear kappa B (NF-κB), entre otros (101, 102).

El exceso de EROs desencadena además en la célula la peroxidación lipídica, una cadena de reacciones no enzimáticas que convierte los ácidos grasos poliinsaturados en carbonilos reactivos tóxicos, que inactivan proteínas mediante la formación de conjugados proteicos covalentes (103). Esta peroxidación lipídica podría a su vez inhibir la replicación del VHC (104).

2.1.5.6. Respuesta inmune e inflamación

Para muchos virus, la respuesta inmune innata, en especial los interferones (IFNs) tipo 1, es la primera línea de defensa que limita la replicación viral y su propagación. Por ello, los virus han desarrollado numerosas estrategias para contrarrestar esta defensa, incluyendo el bloqueo de la inducción de IFNs, la interferencia con señales desencadenas por IFNs o la inhibición de la acción de genes estimulados por IFN (105).

En respuesta a la infección viral son activadas múltiples vías de señalización que participan en la regulación de la expresión de genes relacionados con la inflamación como las enzimas ciclooxigenasa-2 (Cox-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) e interferones. Cox-2 está involucrada en la conversión de ácido araquidónico en prostaglandina H₂ (PGH₂), precursor de varios componentes como la prostaglandina E₂ (PGE₂). Una variedad de factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1), NF- κ B, el factor nuclear de células T activadas (NFAT) y el factor nuclear interleucina-6 (NF-IL6) median la inducción de Cox-2 (106, 107). La sobreexpresión de Cox-2 conduce a un incremento de la molécula proinflamatoria PGE₂. Éste es uno de los mediadores lipídicos más abundantes producidos durante las reacciones inflamatorias y modula la función inmune. De hecho, la inducción de Cox-2 y PGE₂ contribuye a la regulación de la replicación del VHC (108).

2.1.5.7. Metabolismo lipídico

La infección del VHC está también asociada con la resistencia a la insulina y la esteatosis. El estrés del retículo endoplasmático provocado por el VHC puede inducir esteatosis hepática a través de múltiples mecanismos. Por una parte, induce la expresión de genes que regulan la lipogénesis mediante la inducción de la proteína de unión al *enhancer* CCAAT (C/EBP) mediada por el factor de iniciación de la traducción en eucariotas (eIF) 2 α fosforilado (109). Además, PERK potencia la síntesis de lípidos mediada por SREBP atenuando la síntesis de la proteína Insig-1 (gen 1 inducido por insulina) (110). Por otra parte, la inhibición de la traducción proteica mediada por PERK junto con la degradación asociada al retículo endoplasmático daña la secreción lipídica al promoverse la degradación de la apolipoproteína-B (apoB) (111). A esto se suma la inducción de resistencia a insulina mediante la inhibición del sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1) mediada por la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) (112). La proteína core del VHC incrementa directamente la producción de EROs inhibiendo la cadena de transporte de electrones y modificando la permeabilidad mitocondrial (113). Esta producción de EROs, como ya se ha indicado, conduce a la peroxidación de los lípidos de membrana, pero también de proteínas involucradas en el tráfico y secreción, inhibiendo la secreción de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Además, la activación inmune inducida por el virus puede también causar estrés oxidativo mediante la liberación de citoquinas y la activación de macrófagos. La liberación de estas citoquinas, como el TNF α , promueve además la resistencia a la insulina que a su vez favorece el desarrollo de estatosis (114).

El VHC induce esteatosis no sólo vía estrés oxidativo sino también mediante mecanismos alternativos, provocados por las mismas proteínas virales. La expresión de genes involucrados en la biosíntesis, degradación y transporte de lípidos intracelulares está profundamente alterada por la infección (115, 116). La expresión de SREBPs que controlan la transcripción de genes requeridos para la biosíntesis de colesterol (117), es estimulada por la infección del VHC y por la expresión individual de proteínas virales como core, NS2 o NS4B (11, 118, 119); su inhibición causa un descenso en la biosíntesis de ácidos grasos y un subsecuente bloqueo de la replicación del VHC. De igual manera, la expresión de la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS) y otros genes relacionados con la síntesis y transporte de los ácidos grasos está inducida en células infectadas y la inhibición de FAS bloquea la replicación del VHC y la producción de partículas infectivas (8, 120). La infección del VHC conduce también a una reducción de la β -oxidación mediante la inhibición de la expresión de PPAR α (121). Además, la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), clave en la regulación del metabolismo lipídico al aumentar la oxidación de ácidos grasos, parece ser inactivada (desfosforilada) en células infectadas. Así, la inhibición de AMPK por el VHC favorecería la reducción de la β -oxidación y por tanto el incremento de la acumulación lipídica intrahepatocitaria (116).

Un mecanismo específicamente atribuido a la proteína core del genotipo 3 del VHC, que conduce al desarrollo de esteatosis, es la inhibición de la expresión del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), un gen supresor de tumores, regulador negativo de varias vías, como la de AKT. Este mecanismo supone el bloqueo de la traducción del ARNm de PTEN mediante miARNs (122).

2.1.5.8. Papel de los miARNs

Recientemente se han identificado algunos miARNs que juegan un papel importante en la interacción entre el virus y el hospedador, regulando la replicación viral y la patogénesis durante la infección del VHC.

Los miARNs fueron descubiertos en 1993 durante un experimento en el nematodo Caenorhabditis elegans; hasta el día de hoy, se conoce la existencia de más de 2000 miARNs maduros y se estima que aproximadamente el 60% del ARNm podría estar regulado por miARNs (123). Los miARNs constituyen una clase de ARNs no codificantes, de unos 18-22 nucleótidos de longitud, que juegan un papel clave en la regulación de la expresión génica. La producción de miARNs requiere varios pasos de procesamiento (Figura 6): inicialmente, miARNs primarios (pri-miARNs) son escindidos por la ribonucleasa Drosha para producir miARNs precursores (pre-miARNs) que a su vez, son escindidos por la ribonucleasa Dicer para producir miARNs maduros de cadena sencilla. Una vez sintetizados, los miARNs se asocian a RISC (complejo silenciador inducido por ARN) junto con las proteínas Argonauta/eIF2C y median el reconocimiento del ARNm diana. Este reconocimiento tiene lugar gracias a interacciones de pares de bases entre el extremo 5' del miARN y sitios dentro de las regiones codificantes y no traducidas (UTRs), especialmente la región 3' UTR. Los miARNs inhiben la expresión génica, bien mediante degradación del ARNm o represión de la traducción (124).



Figura 6. Proceso de formación de miARNs. Modificado de Winter et al., 2009 (124).

El miARN más abundante en el hígado es el miR-122, el cual es regulado por el factor de transcripción HNF4 α (factor nuclear hepático 4 α) (125) y es responsable de la homeostasis del hígado (126). Varios estudios han demostrado que el miR-122 es necesario para la replicación del VHC en células infectadas (127). Este miARN modula positivamente la infección mediante interacción directa con el ARN viral y estimula la traducción. Para ello se forma un complejo en el cual un miR-122 se une a la región 5' UTR del ARN viral y recluta a Argonauta 2 en dicho extremo 5', estabilizando el ARN viral y evitando la degradación en células infectadas (128).

Además, existen otros miARNs implicados en la replicación del VHC. Así, la sobreexpresión de miR-448 y miR-196 es capaz de atenuar la replicación viral mediante interacción con las regiones del genoma del VHC que codifican para

core y NS5A, respectivamente (129). De manera similar, el miARN let-7b presenta actividad anti-VHC gracias a la posesión de sitios de unión a las secuencias codificantes de NS5B y la región 5' UTR del genoma viral (130). En células infectadas con los genotipos 1b o 2a del VHC, se ha conseguido inhibir la replicación del virus mediante la sobreexpresión del miR-199a (131). Asimismo, el miR-196a es capaz de inhibir la expresión del VHC mediante la regulación de la expresión de hemo-oxigenasa 1/homólogo 1 de BTB (*bric-a-brac*) y CNC (*cap-n-collar*) (HMOX1/Bach1) (132). Además, se ha observado que en pacientes infectados con el VHC hay una menor expresión del miR-29 en el hígado y una sobreexpresión de este miARN inhibe el ARN viral en hepatocitos infectados con el virus (133). También se ha demostrado que el miR-130a está sobreexpresado en pacientes con VHC así como en hepatocitos infectados *in vitro* con el VHC (134). Otros miARNs como miR-24, miR-149, miR-638 y miR-1181 están involucrados en la entrada viral, replicación y propagación (135).

2.1.6. Diagnóstico de la infección con VHC

Los procedimientos de diagnóstico están basados en la detección de anticuerpos anti-VHC mediante el uso de tests ELISA. Estos ensayos emplean antígenos recombinantes y de proteínas no estructurales, habíendose desarrollado hasta cuatro generaciones diferentes de este tipo de test (136). La presencia de anticuerpos anti-VHC en el suero no quiere decir que el paciente tenga infección con VHC, puesto que la persona puede haber padecido la enfermedad con anterioridad. Además, la infección puede ocurrir en una persona inmunodeprimida en la cual no se detectan anticuerpos.

Por todo ello, es necesario realizar una prueba adicional que detecte material genético del virus en la sangre. La técnica de RT-PCR es la más utilizada en este caso, haciendo más fácil el diagnóstico y el seguimiento de la progresión de la viremia. Además, el uso de la RT-PCR multiplex es otro avance en la detección en un solo análisis de posibles co-infecciones por varios virus de la hepatitis (137, 138). La técnica de RT-PCR permite además detectar la infección

en fases más tempranas, ya que el ARN del VHC puede ser detectado de 1 a 2 semanas después de la infección mientras que los anticuerpos son detectados de 3 a 8 semanas después de la infección (3).

2.1.7. Tratamiento

El tratamiento convencional para la hepatitis C crónica ha consistido hasta mayo de 2011 en la combinación de interferón (IFN) α pegilado junto con ribavirina, permitiendo la FDA posteriormente el uso de los primeros agentes que actúan directamente contra el virus C (boceprevir y telaprevir).

El principal objetivo del tratamiento es eliminar el virus, lo que se conoce como respuesta virológica sostenida (RVS), definida como la ausencia de ARN viral en suero seis meses después de la interrupción de la terapia. Las tasas de RVS obtenidas en pacientes tratados con pegIFN más rivabirina han sido del 40-50% para aquellos con el genotipo 1 del VHC y del 80% para los genotipos 2 y 3.

Los avances recientes se basan en el desarrollo de agentes que actúan directamente sobre el virus (DAAs) y la identificación de polimorfismos en el gen interleucina (IL)-28, que está asociado con la respuesta al tratamiento antiviral convencional. Los candidatos para un tratamiento antiviral son pacientes con una extensión de fibrosis significativa independientemente de la concentración de las enzimas transaminasas en suero, esencialmente en aquellos con cirrosis compensada. En los pacientes con el genotipo 1 del VHC, el tratamiento convencional se debería considerar cuando haya factores predictivos de una respuesta favorable (polimorfismo CC para IL28, inexistencia de un tratamiento anterior y ausencia de una fibrosis avanzada). De no ser así, el tratamiento convencional junto con telaprevir o boceprevir es el tratamiento de elección (139). El uso de telaprevir sólo o en combinación con pegIFN y rivabirina parece reducir el ARN del VHC en pacientes infectados con el genotipo 2, pero no en aquellos infectados con el genotipo 3 (140), aunque se recomienda una terapia antiviral convencional para los pacientes con el genotipo2, además de aquellos con los genotipos 3 o 4. Los agentes boceprevir y telaprevir pertenecen a la

familia de los inhibidores de las serina proteasas NS3 y NS4A y se administran en combinación con pegIFN y ribavirina (terapia triple). Si se administran de manera individual rápidamente inducen la aparición de resistencia. Los principales inconvenientes del uso de estos agentes son la mayor tasa de efectos adversos, el riesgo de resistencia, interacciones con otros medicamentos y su elevado coste. En pacientes con el genotipo 1 este tipo de inhibidores administrados como triple terapia con pegIFN y ribavirina mejoran significativamente la tasa de RVS (139).

Hay otra serie de medicamentos en desarrollo, como son nucleósidos sintéticos que actúan sobre el sitio activo de la polimerasa NS5B evitando la replicación viral. Estos agentes son activos frente a todos los genotipos aunque tienen efectos colaterales de toxicidad gastrointestinal. Otro tipo de inhibidores se unen a sitios alostéricos menos conservados en la enzima viral y bloquean los cambios conformacionales para evitar las acciones del virus. Este tipo sólo es activo frente al genotipo 1. Existen también inhibidores de NS5A, como el BMS 790052, que inhiben fuertemente la replicación del VHC. Son activos contra todos los genotipos y pueden ser combinados con otros antivirales. Los inhibidores de ciclofilina se unen a las proteínas de la célula hospedadora que facilitan la replicación viral. Ya que se trata de agentes que no actúan directamente contra el virus es menos probable la aparición de resistencia (24). El potencial terapéutico de SPC3649, un oligonucleótido complementario al extremo 5' del miR-122, ha sido evaluado en chimpancés infectados con VHC. La terapia con dicho agente resulta en una reducción de la carga viral en hígado y sangre de chimpancés infectados crónicamente. Además, este efecto se acompañó de una normalización de la vía del interferón endógeno, que está inducida significativamente en dichos animales, lo que sugiere una restauración de la respuesta inmune del hospedador tras el tratamiento con SPC3649 (141). Miravirsen, otro oligonucleótido similar que actúa sobre miR-122, ha mostrado una reducción dependiente de la dosis de la concentración de ARN del VHC sin evidencia de resistencia viral en pacientes infectados con el genotipo 1 durante ensayos clínicos en fase II (142). No se han documentado efectos adversos de la inhibición del miR-122 ni en chimpancés ni en pacientes infectados crónicamente.

La infección con el VHC es única en su dependencia y modificación del metabolismo lipídico del hospedador. De hecho, el acúmulo intrahepatocitario de lípidos inducido por el virus contribuye a una peor respuesta al tratamiento. Por ello, incluir terapias moduladoras del metabolismo lipídico junto con los agentes antivirales puede incrementar la efectividad del tratamiento (14). Además, como ya se ha indicado anteriormente, las terapias dirigidas contra factores del hospedador no presentan el problema del desarrollo de resistencia viral debida a la variabilidad genotípica del virus que se puede dar en el caso del tratamiento con DAAs. Así, el uso de estatinas, que son inhibidores de la 3hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA), clave en la síntesis de colesterol, junto con un tratamiento antiviral convencional, contribuye a un descenso de la esteatosis hepática y una mejora de la eficacia del tratamiento antiviral (143). Sin embargo, la administración de estatinas de manera individual se ha visto que puede tener efectos contradictorios sobre la carga viral (144), no así en combinación con pegIFN o pegIFN y ribavirina, situación en la que muestra un fuerte efecto sinérgico (145).

Se están investigando otras estrategias como la combinación con agonistas o antagonistas de PPAR o con ácido nicotínico, así como el uso de antagonistas del miARN 122, que también tiene un papel importante en el metabolismo lipídico (141, 146). Dada también la relación de la enfermedad con la resistencia a la insulina, se ha propuesto la combinación del tratamiento convencional con sensibilizantes a la insulina como la metformina o las tiazolidinedionas (147, 148). Además, componentes naturales que afectan al metabolismo lipídico como el flavonoide naringenina del pomelo (149), así como la epigalocatequina-3galato (EGCG), aislada del té verde, muestran un efecto antiviral (150).

2.1.8. Modelos de estudio in vivo e in vitro de la hepatitis C

El conocimiento en relación con los mecanismos implicados en procesos como la entrada del VHC a la célula hospedadora, ciclo de vida o replicación, se ha visto limitado por la escasez de modelos experimentales adecuados para su estudio. Los humanos y otros primates son los únicos organismos conocidos que permiten la infección del VHC. El coste económico y aspectos éticos obvios limitan el estudio de la enfermedad en chimpancés.

Desde que fue descubierto el VHC pasaron diez años hasta que se estableció el primer modelo efectivo en cultivo celular con replicación autónoma del VHC (151). Posteriormente se establecieron otros replicones subgenómicos del VHC para otros aislados del genotipo 1b así como para el genotipo 1a (asilado H77) y 2a (aislado JFH1) (152). Sólo el genotipo 2a, clonado a partir del suero de un paciente japonés con hepatitis fulminante, permite la producción de partículas infectivas del VHC en cultivo celular; aún así, este sistema está limitado por una tasa de infección y un título viral bajos (153). Aparte de estos sistemas de cultivo, se han desarrollado otros modelos para el estudio de la entrada del virus, útiles para identificar los receptores de la célula hospedadora necesarios para la infección del virus (154).

El estudio del VHC en chimpancés ha proporcionado un gran conocimiento acerca del mecanismo de infección, replicación y respuesta inmune innata y humoral. Los chimpancés difieren de los humanos en que en ellos el curso de la infección es más leve; los portadores crónicos no desarrollan cirrosis o fibrosis y sólo se ha documentado el caso de un chimpancé que desarrollara carcinoma hepatocelular relacionado con la infección del VHC (155).

Existen otros modelos animales que han permitido examinar con detalle la infección del VHC, la replicación y la respuesta del hospedador, y que se han llevado a cabo en tupayas, ratones y ratas. Las tupayas son susceptibles a una variedad de virus humanos como virus herpes simple, rotavirus y virus de la hepatitis B (VHB). Estos animales infectados con el VHC muestran una

inflamación y viremia leves durante la infección aguda, seguido del desarrollo de esteatosis, nódulos cirróticos y tumorogénesis. Las tupayas suponen un modelo efectivo para estudios acerca de la entrada y replicación del VHC. Una desventaja de este modelo es que, a diferencia de lo que ocurre en humanos con VHC, estos animales rara vez mantienen una viremia sostenida (156).

Las células hepáticas de ratón son resistentes a la entrada del VHC y permiten sólo la replicación ineficiente en cultivo celular y en animales. La entrada del virus en cultivo celular sólo tiene lugar en células genéticamente modificadas para expresar las moléculas humanas necesarias para la entrada del VHC, incluyendo CD81 y ocludina. Dorner et al. (157) desarrollaron un modelo de ratón humanizado mediante ingeniería genética para estudiar la entrada del virus y la inmunidad. Estos ratones fueron modificados para expresar los factores humanos CD81, ocludina, SR-BI y CLDN1. Este modelo presenta una replicación viral y una persistencia de la infección limitadas, pero permite llevar a cabo estudios de inmunización pasiva o estrategias de vacunación para evitar la infección aguda del virus antes o después de la exposición, como la administración de anticuerpos anti-CD81 y anti-E2, los cuales disminuyen la infección del VHC. Existen otros modelos, entre ellos el basado en la utilización de ratones inmunodeficientes que permiten la proliferación de hepatocitos humanos trasplantados y mantener una infección del VHC sostenida (158). Este modelo ha sido usado para estudiar agentes antivirales como el IFN α2 anti-NS3 y anti-NS5B o el telaprevir (159). Las limitaciones de este modelo son la falta de un sistema inmune complejo y la incapacidad de conseguir un hígado completamente humanizado.

Ouyang *et al.* (160) crearon un modelo de rata inmunocompetente tolerante a hepatocitos humanos. Éste supone un modelo en un roedor lo suficientemente grande como para tolerar repetidas tomas de muestras de sangre y tejido para estudiar la entrada viral, la replicación y el daño hepático inmunomediado; también supone una herramienta para evaluar nuevos agentes

31

antivirales. Las limitaciones de este modelo incluyen un bajo número de hepatocitos trasplantados y unos niveles de viremia relativamente bajos en comparación con aquellos observados en una infección típica humana.

2.2. Esteatosis

2.2.1. Introducción

La enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) es una de las enfermedades hepáticas crónicas más comunes de los países occidentales. Está considerada como una manifestación del síndrome metabólico (161) e incluye un espectro de alteraciones que van desde la simple esteatosis a la esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma, y cuya evolución depende de "múltiples impactos" (162). Su incidencia en niños y adultos está aumentando rápidamente debido al incremento de la obesidad y diabetes de tipo II (163). Se estima que alrededor del 20-30% de los adultos tienen NAFLD (164). Los factores de riesgo más importantes son obesidad central, resistencia a la insulina, hiperglucemia en ayuno e hipertrigliceridemia (165).

2.2.2 Patogénesis e histopatología

La enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) está caracterizada por un incremento de la acumulación de lípidos en el hígado, lo cual puede deberse a múltiples factores (Figura 7), como el aumento de la lipolisis en los adipocitos o el incremento de grasa en la dieta que conducen a un aumento de la captura de ácidos grasos por los hepatocitos. La disfunción mitocondrial normalmente precede a NAFLD y podría causar acumulación lipídica debido al fallo de la β-oxidación. Además, la lipogénesis *de novo* contribuye enormemente al desarrollo de esteatosis. Por último, la reducción de la eliminación de lípidos, vía VLDL, puede empeorar esta situación (166).



Figura 7. Factores que contribuyen al desarrollo de esteatosis. Modificado de Koo, 2013 (166).

La acumulación de lípidos en el hígado está además ligada a la progresión del estrés del retículo endoplasmático y de la mitocondria y a una alteración del proceso de autofagia, dando lugar a una condición denominada lipotoxicidad (167). La simple acumulación hepática de triglicéridos puede evolucionar a esteatohepatitis (NASH), caracterizada por una esteatosis severa, inflamación y daño, y apoptosis hepatocelular con la activación de fibrogénesis (168), que puede progresar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (6).

La característica histológica más importante de NAFLD es la esteatosis de los hepatocitos. Ésta se clasifica en macrovesicular y microvesicular. La esteatosis macrovesicular está caracterizada por grandes vacuolas que ocupan prácticamente todo el citoplasma y que desplazan el núcleo hacia la periferia. La esteatosis microvesicular está caracterizada por numerosas pequeñas vacuolas lipídicas y una posición central del núcleo celular. Típicamente, la esteatosis en NAFLD es centrolobular y macrovesicular. Sin embargo, la esteatosis puede estar presente por todo el lóbulo y puede haber también esteatosis microvesicular.

En el caso de NASH además hay inflamación intralobular y balonización, lo que suele ir acompañado por fibrosis. También puede haber hialina de Mallory

presente. La inflamación intralobular suele ser leve y de tipo mixto, incluyendo la presencia limitada de linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Los neutrófilos suelen infiltrarse en la zona de marcada esteatosis y alrededor de la hialina de Mallory. La inflamación portal es normalmente leve, aunque puede existir una inflamación crónica intensa en el área portal. La balonización es una forma de daño hepático caracterizado por hepatocitos hinchados con un citoplasma alterado, presentes sobretodo cerca de los hepatocitos esteatósicos, típicamente en la zona 3 (169, 170). La hialina de Mallory es una estructura eosinófila y amorfa, observada en hepatitis alcohólica, NASH, colestasis crónica y carcinoma hepatocelular (171, 172). En NASH se encuentra con más frecuencia en áreas de fibrosis perisinusoidal en la zona 3 y puede ir acompañada por la infiltración de neutrófilos. Otra característica de NASH es la presencia de quistes de grasa y lipogranulomas, así como megamitocondrias y depósitos de hierro. La fibrosis se origina normalmente en las regiones perisinusoidales de la zona 3 y también suele estar presente en el área periportal (169, 170).

Se han creado tres sistemas importantes de clasificación para NAFLD: la clasificación de Matteoni (173), la clasificación de Brunt (174) y el índice de actividad histológica de NAFLD (168).

2.2.3. Regulación del metabolismo lipídico

2.2.3.1. Lipogénesis de novo

La lipogénesis *de novo* es una vía metabólica que incluye la glucolisis y la biosíntesis de ácidos grasos saturados seguida de la desaturación y la formación de triglicéridos. Las enzimas clave limitantes de la velocidad de este proceso son la glucoquinasa (GK) y la piruvato quinasa (PK) en la glucolisis, la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) en la síntesis de ácidos grasos, la elongasa 6 de ácidos grasos (ELOVL6) y la estearoil-CoA desaturasa (SCD) en la formación de ácidos grasos monoinsaturados y la glicerol-3-fosfato acetiltransferasa (GPAT), las lipinas y la acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) en la formación de triglicéridos (166).

Los factores de transcripción SREBP-1c y ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) están involucrados en la activación transcripcional de los genes que codifican para estas enzimas claves de la lipogénesis y se han asociado al incremento de la lipogénesis de novo en NAFLD. SREBP-1c es un miembro de la familia SREBP que controla la regulación transcripcional del metabolismo lipídico (117). La expresión de SREBP-1c está muy inducida por la insulina bajo condiciones de alimentación y por ácidos grasos saturados bajo alimentación con dieta rica en grasa en ratones. Asimismo, está descrito que LXR α resulta crítico en la activación transcripcional de SREBP-1c en este proceso (175). La actividad de SREBP-1c puede ser activada además por la vía de mTOR e inhibida por la proteína quinasa A (PKA), AMPK y quinasas inducibles por sal (SIKs) (176-178). ChREBP se identificó en un principio como regulador de la glucólisis hepática y después se vio que estaba implicado en la regulación de otros genes lipogénicos de la vía (179). En condiciones de concentraciones bajas de glucosa, ChREBP está presente en el citoplasma gracias a la fosforilación mediada por PKA, pero tras la desfosforilación, asociación con Mlx (proteína X tipo MAX) y localización nuclear bajo condiciones de alta concentración de glucosa, produce la activación transcripcional de genes diana en el hígado. En ratones ob/ob, obesos y resistentes a insulina, tanto SREBP-1c como ChREBP son muy abundantes en el hígado, y la reducción de cualquiera de ellos resulta beneficiosa al disminuir la esteatosis, resaltando la importancia de estos factores de transcripción lipogénicos en la síntesis de novo de lípidos y en la acumulación de triglicéridos en el hígado (180, 181).

LXRs

Los receptores X del hígado (LXRs) son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Se identificaron por primera vez en 1994 y fueron clasificados inicialmente como receptores nucleares "huérfanos" debido a que sus ligando naturales eran desconocidos (182). Más tarde se identificaron varios ligandos fisiológicos para estos receptores. Existen dos isoformas de LXR, LXR α (NR1H3) y LXR β (NR1H2), las cuales están altamente relacionadas y comparten alrededor del 78% de la secuencia de aminoácidos en los dominios de unión al ligando y al ADN. Se pueden encontrar altos niveles de LXR α en bazo, hígado, tejido adiposo, intestino, riñón y pulmón, mientras que LXR β se expresa en todos los tejidos. Tras la activación inducida por el ligando, las dos isoformas de LXR forman heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR) y regulan la expresión génica mediante su unión al elemento de respuesta de LXR (LXRE) en el promotor de sus genes diana. LXRE está formado por dos secuencias de hexanucleótidos (AGGTCA) separados por 4 bases (elemento DR-4).

El heterodímero LXR/RXR puede ser activado por ligandos para cada uno de los componentes de manera independiente. En ausencia de ligandos, LXR está unido a complejos de represores que son intercambiados por coactivadores cuando se produce la activación del receptor (183). Los oxiesteroles son agonistas endógenos de LXR. Los activadores más potentes dentro de este grupo son el 22(R)-hidroxicolesterol y el 20(S)-hidroxicolesterol, ambos intermediarios de la síntesis de hormonas esteroideas, el 24(S)-hidroxicolesterol, producido en el cerebro y el principal oxiesterol del plasma humano, y el 24(S),25epoxicolesterol, abundante en el hígado. Todos ellos se unen a LXR y estimulan su actividad transcripcional a concentraciones dentro del rango fisiológico (184). La D-glucosa y la D-glucosa-6-fosfato son también agonistas endógenos de LXR y muestran una eficacia semejante a la de los oxiesteroles (185); dicha respuesta de LXR a glucosa, parece requerir su modificación post-traduccional por la O*linked* β -N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) (186). Además, se han desarrollado una serie de agonistas sintéticos como son T0901317 y GW3965. T0901317 es capaz asimismo de activar el receptor X de pregnano (PXR) (187).

Existen también inhibidores de LXR, como el geranilgeranil pirofosfato (GGPP), un intermediario de la síntesis de colesterol que ejerce su acción antagonista mediante su interacción con los coactivadores de LXR (188). Otros

inhibidores de la actividad transcripcional de LXR son los sulfatos de colesterol oxidado (189). Los ácidos grasos poliinsaturados también pueden tener un efecto antagonista de LXR en algunas líneas celulares (190), aunque no se ha visto el mismo efecto en el hígado de ratas o en hepatocitos (191).

La actividad de LXR además está regulada por la modificación de su expresión. Así, la actividad de LXR α está controlada por un mecanismo de autorregulación, presentando un LXRE en su promotor que puede ser activado por ambas isoformas de LXR (192). Este efecto es específico de células humanas, aunque se ha encontrado también el mismo mecanismo de regulación en el tejido adiposo blanco de ratones (193). Tanto en humanos como en ratones el promotor de LXR α contiene un elemento de respuesta al proliferador de peroxisomas (PPRE) y, por tanto, agonistas de PPAR α y PPAR γ pueden estimular la expresión de LXR α (192). La insulina también aumenta la expresión de LXR α (194), y la proteína quinasa A puede regular la actividad transcripcional de LXR α de manera post-traduccional fosforilando al receptor en dos localizaciones e impidiendo así su dimerización y unión al ADN (195).

Los receptores LXRs regulan la expresión de un conjunto de genes implicados en el metabolismo y transporte de colesterol. Así, actúan como sensores clave de la concentración de esterol y en respuesta a una sobrecarga de colesterol estimulan su transporte reverso y su excreción biliar e inhiben su absorción intestinal y su síntesis *de novo*. LXRs inducen la excreción biliar de colesterol mediante el aumento de la expresión del citocromo CYP7A1, una enzima clave en la síntesis de ácidos biliares (184); la regulación de esta enzima por parte de LXR no ocurre en humanos, lo que es responsable de una mayor susceptibilidad a la hipercolesterolemia inducida por la dieta (196). Además de estimulando la síntesis de ácidos biliares, LXR promueve la excreción de colesterol incrementando la transcripción de los transportadores *ATP-binding casette* (ABC) G5 y G8 en el hígado, los cuales transportan el colesterol desde los hepatocitos a la bilis. Estos transportadores también tienen un papel importante en la absorción intestinal de colesterol, devolviendo hacia la luz del intestino el colesterol absorbido (197). Otra proteína importante en la absorción de colesterol de la dieta es NPC1L1 (*Niemann-Pick C1 like 1*), la cual es inhibida por LXR (198). En la síntesis de colesterol *de novo* están implicados diversos genes cuya expresión está controlada por miembros de la familia SREBPs (12), que a su vez están regulados por LXR. El transporte reverso de colesterol supone la recogida del exceso de colesterol de los tejidos y su conducción hacia el hígado en forma de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o apolipoproteínas libres de lípidos para su excreción en la bilis. En este proceso juegan un papel importante transportadores ABCA1 y ABCG1 (199), los que están activados transcripcionalmente por LXR. Otro gen regulado por LXR es apoE; éste codifica para una apolipoproteína presente en la superficie de las lipoproteínas plasmáticas que es un ligando de alta afinidad del receptor de LDL. ApoE es reguerida para la captación hepática de residuos de guilomicrones, VLDL y algunos subtipos de HDLs, y sirve de aceptor extracelular para el colesterol (200).

Además de regular el metabolismo de colesterol, LXRs regulan la biosíntesis hepática de ácidos grasos. Este proceso está controlado por SREBP-1c, que regula todos los genes implicados en la vía. Numerosos estudios muestran el papel activador de LXRα sobre SREBP-1c y también sobre ACC, FAS y SCD-1, los cuales presentan LXREs funcionales en su promotor (12). Otro gen importante que controla la expresión de los genes lipogénicos es ChREBP, que a su vez presenta en su promotor dos LXREs (201).

La esteatosis hepática inducida por la activación de LXRα no sólo se debe a la estimulación de la síntesis de ácidos grasos, sino también al incremento de la captación de ácidos grasos libres, ya que la translocasa de ácidos grasos FAT/CD36 está también regulada por LXRα y contiene un LXRE funcional en su promotor (13).

38

SREBPs

Las proteínas de unión al elemento regulador de esteroles tienen una gran importancia en la regulación de la concentración intracelular de colesterol, así como en la homeostasis de todos los lípidos. Llevan a cabo un mecanismo de retroalimentación negativa, detectando la concentración intracelular de colesterol; cuando es baja, se estimula la expresión de genes que codifican para las proteínas implicadas en la síntesis de colesterol y de ácidos grasos y en la captación de lipoproteínas.

La vía de SREBP es importante en el desarrollo de diferentes condiciones patológicas, asociadas con la obesidad y el síndrome metabólico, como son la esteatosis y la hiperlipidemia. Además, estas proteínas intervienen en otros procesos como crecimiento celular e inmunidad innata (202).

La familia SREBP consiste en tres subtipos: SREBP-1a y SREBP-1c (gen SREBF1) y SREBP-2 (gen SREBF2). Todos ellos son factores de transcripción que se unen al elemento regulador de esteroles (SRE) de sus genes diana. SREBP-1a regula la expresión de genes implicados tanto en la síntesis de colesterol como de ácidos grasos, SREBP-1c estimula genes lipogénicos y SREBP-2 induce la expresión de las enzimas de síntesis de colesterol (12). Son sintetizados como proteínas de membrana del retículo endoplasmático que requieren de un proceso proteolítico de dos pasos en el aparato de Golgi para poder llevar a cabo su actividad transcripcional. En este proceso tiene importancia la proteína activadora de la escisión de SREBP (SCAP). SREBP forma un complejo con SCAP en la membrana del retículo endoplasmático. Cuando hay suficientes esteroles en la célula, SCAP sufre un cambio de conformación que favorece su unión a Insig, el cual bloquea la translocación del complejo SREBP-SCAP al aparato de Golgi donde tiene lugar la activación proteolítica. Si no hay una cantidad suficiente de esteroles, el complejo SREBP-SCAP se separa de Insig y se transloca al aparato de Golgi, donde SREBP es procesado por dos proteasas. La forma

activa de SREBP migra al núcleo para activar la transcripción de sus genes diana (203).

Además de activar la transcripción de genes importantes en el metabolismo lipídico, SREBP induce su propia transcripción ya que presenta un SRE. Existen genes con un SRE cuya expresión es inhibida por SREBP; es el caso de genes como MTP (proteína microsomal de transporte de triglicéridos) (204) o el que codifica para la caveolina (205). La actividad transcripcional de SREBP requiere de varios cofactores cuyos sitios de unión se encuentran en el promotor de sus genes diana y además son importantes para el ensamblaje de la maquinaria de transcripción (206). La cantidad total de SREBP-1c en hígado y tejido adiposo se reduce en ayuno, al reducirse la concentración de insulina y aumentarse la de glucagón, y aumenta tras la ingesta. SREBP-1c puede también contribuir a la regulación de la captación de glucosa y de su síntesis mediante la inducción de la expresión de la glucoquinasa, la enzima clave en la utilización de glucosa (207).

PPARs

La subfamilia PPAR está compuesta de tres proteínas relacionadas, PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ (NR1C1, NR1C2 y NR1C3 respectivamente). Los ligandos endógenos de PPARs son lípidos tales como ácidos grasos insaturados, eicosanoides, componentes de LDL oxidado, VLDL y derivados del ácido linoleico (208).

PPAR α promueve el catabolismo de ácidos grasos, la gluconeogénesis, la cetogénesis y el ensamblaje de lipoproteínas. Está altamente expresado en tejidos metabólicos como el hígado, el tejido adiposo pardo, el corazón, el músculo esquelético y el riñón y en unos niveles muchos más bajos puede también encontrarse en algunas células del sistema inmune. Este receptor controla genes involucrados en la función mitocondrial, captación de ácidos grasos, β -oxidación, expresión de apolipoproteínas y metabolismo de triglicéridos (209).

40

PPARβ/δ se expresa de manera ubicua y está implicada en el desarrollo, la reproducción, la inflamación, la inmunidad, el desarrollo de neoplasias y el metabolismo. Su activación potencia el transporte de ácidos grasos y su oxidación, mejora la homeostasis de la glucosa mejorando la sensibilidad a la insulina e inhibiendo la salida de glucosa, atenúa la respuesta inflamatoria de los macrófagos e incrementa las concentraciones de HDL en plasma (210).

PPARγ tiene tres isoformas, PPARγ1, PPARγ2 y PPARγ3. Se expresa predominantemente en tejido adiposo, colon, células mieloides y placenta y regula genes como aP2 (proteína adipocitaria de unión a ácido graso), PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa), LPL (lipoproteína lipasa), UCP1 (proteína desacoplante), FAT/CD36 y LXRα. Promueve la captación de ácidos grasos por el adipocito y disminuye la concentración de los mismos en el hígado (211, 212). Sin embargo, una expresión elevada de PPARγ es una característica del hígado esteatósico, debido a su papel en mecanismos que implican la activación de genes lipogénicos y de la lipogénesis *de novo* (213).

2.2.3.2. Captación y transporte

Los ácidos grasos libres en la sangre pueden ser captados por el hígado y servir como fuente importante para la síntesis de triglicéridos en dicha localización. Normalmente los ácidos grasos libres del plasma son generados por los adipocitos blancos mediante lipolisis, la cual es inducida por agonistas de los receptores β-adrenérgicos como las catecolaminas, bajo condiciones de ayuno. Este proceso es revertido por la insulina tras la ingesta, limitando la liberación de ácidos grasos e induciendo la lipogénesis *de novo* en este tejido. Cuando existe resistencia a la insulina la lipolisis está hiperactivada en los adipocitos, resultando en un incremento de ácidos grasos libres en el plasma (214).

Las principales proteínas implicadas en la captación y transporte de ácidos grasos libres son la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), caveolinas, la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y la proteína de unión a ácidos grasos (FABP).

En mamíferos existen 6 miembros de FATPs, encontrándose FATP2 y FATP5 altamente expresadas en el hígado. Todas las FATPs presentan en común una región para la captación de ácidos grasos y la función acil-CoA sintetasa. Está descrito que ratones que están modificados genéticamente para no expresar FATP5 muestran resistencia a una dieta inductora de obesidad y a la acumulación de triglicéridos, aunque no hay evidencias clínicas de la implicación de esta proteína en la obesidad humana (215).

Las caveolinas son una familia de proteínas, caveolinas 1, 2 y 3, que se encuentran en unas estructuras denominadas caveolas, importantes para el tráfico de proteínas y la formación de gotas lipídicas (166).

FAT/CD36 es una proteína transmembrana que acelera la captación de ácidos grasos mediante difusión facilitada. En pacientes con NAFLD, la concentración de FAT/CD36 se correlaciona positivamente con la concentración de triglicéridos en el hígado, por lo que esta proteína tiene una gran importancia en esta enfermedad (216).

Las FABPs son proteínas citosólicas de unión a ácidos grasos que facilitan el transporte intracelular de los ácidos grasos libres. De entre los 9 miembros de esta familia, FABP1 y FABP5 se encuentran altamente expresados en el hígado. En pacientes con NAFLD existe una correlación entre la infiltración de ácidos grasos y la expresión de FABP4 y FABP5 en el hígado (217). Además, FABP1 se encuentra disminuida en pacientes con NAFLD y en ratones con la misma patología inducida mediante una dieta deficiente en metionina y colina (MCD) (218).

2.2.3.3. Vías de oxidación de ácidos grasos

La β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria es un proceso en el que los ácidos grasos se reducen a acetil-CoA, el cual puede ser convertido en cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato o acetoacetato) o incorporado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos para su completa oxidación.
En un principio, los acil-CoA deben ser transportados a través de las membranas mitocondriales gracias a la actividad de dos unidades de carnitina palmitoil transferasas (CPTs). Son convertidos a acil-carnitinas por CPT1 en la membrana externa mitocondrial para su transporte al espacio intermembrana. Posteriormente, CPT2 convierte éstos en acil-CoA de nuevo para su β -oxidación en el interior de la mitocondria (219).

El primer paso supone la β -deshidrogenación del acil-CoA por acil-CoA deshidrogenasas específicas de longitud de cadena (VLCAD, LCAD y MCAD). Una deficiencia de MCAD y VLCAD produce el desarrollo de esteatosis en ratones, lo que demuestra el papel de estas proteínas y de la β -oxidación de ácidos grasos en el acúmulo de triglicéridos (220). 2-enoil-CoA hidratasa, 2-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y 3-oxoacil-CoA tiolasa son las siguientes enzimas que completan de manera subsecuente la β -oxidación de los ácidos grasos hasta acetil-CoA.

En condiciones de ayuno, la β -oxidación está potenciada en parte por la inactivación de ACC, lo que resulta en una disminución de la producción de malonil-CoA, que actúa como un potente inhibidor de CPT1 (221). Un ayuno prolongado también incrementa la expresión de los genes de la β -oxidación mediante mecanismos transcripcionales. PPAR α y su co-activador, el co-activador 1 de PPAR γ (PGC-1 α) son claves para potenciar la expresión de los genes CPT1, LCAD, MCAD y acil-CoA oxidasa (AOX) (209).

2.2.3.4. Secreción de triglicéridos

La secreción de triglicéridos se consigue gracias a la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lípidos con un núcleo hidrofóbico que contienen triglicéridos y ésteres de colesterol, cubiertos por fosfolípidos hidrofílicos y apoB 100. El proceso de formación de las VLDL ocurre inicialmente en el retículo endoplasmático rugoso durante la traducción y translocación de apoB 100, dando lugar a la formación de una apoB 100 parcialmente lipídica (pre-VLDL) que es después transportada al aparato de Golgi para su maduración y posterior liberación del hígado mediante exocitosis. La hormona anabólica insulina es clave en la regulación de la formación y secreción de VLDL. En los casos de resistencia a la insulina, al verse alterado este proceso, se produce una hipertrigliceridemia al incrementarse la secreción de triglicéridos. Sin embargo, la velocidad de secreción de triglicéridos no se puede equiparar a la incrementada velocidad de síntesis de triglicéridos bajo esta condición, lo cual resulta en una esteatosis hepática a pesar de la elevada velocidad de secreción de VLDL, de manera similar a lo observado en pacientes con NAFLD, que presentan tanto hipertrigliceridemia como esteatosis.

Una exposición prolongada del hígado a ácidos grasos libres induce estrés de retículo endoplasmático y otros tipos de estrés oxidativo en el hígado, conduciendo a la degradación de apoB 100 y al subsecuente descenso de secreción de VLDL, provocando un empeoramiento de la esteatosis hepática (222).

2.2.3.5. Papel de los miARNs

Se ha descrito el papel de varios miARNs en la regulación del metabolismo lipídico. Así, miR-122 interviene en la regulación de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y su oxidación, como FAS, ACC1 y ACC2 (146). miR-370 tiene efectos similares sobre el metabolismo lipídico, controlando a CPT1A, la enzima carnitina palmitoil transferasa que media el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial mediante su unión a carnitina, reduciendo la oxidación de los ácidos grasos. Este miARN parece que también aumenta la expresión de miR-122 y conduce a la sobreexpresión de genes lipogénicos como SREBP-1c y DGAT2 (223). miR-378/378* es un miARN localizado en un región intrónica del gen PGC-1 α y su sobreexpresión durante la atipogénesis incrementa la acumulación de triglicéridos. También aumenta la expresión de triglicéridos también aumenta la acumulación de triglicéridos también aumenta la acumulación de triglicéridos también aumenta la expresión de adipocitos (225-227).

Uno de los miARNs más importantes en la regulación del metabolismo lipídico es miR-33a, localizado en el intrón 16 del gen SREBF2. Este miARN parece tener un papel clave como regulador post-transcripcional en la homeostasis de colesterol (228). Existe otra isoforma, miR-33b, dentro del gen SREBF1, que sólo difiere en dos nucleótidos de la otra isoforma (228). miR-33 también controla algunos genes involucrados en la β -oxidación, y su sobreexpresión provoca una disminución de la expresión de los mismos y por tanto de la β -oxidación (229).

2.2.4. Hepatitis C y esteatosis

Aproximadamente el 50% de los pacientes infectados con VHC tienen esteatosis (5). Aunque la esteatosis puede estar asociada a todos los genotipos de VHC, hay una evidencia clara de que la esteatosis es más prevalente y severa en sujetos infectados con el genotipo 3 (230). La importancia de la esteatosis en pacientes con hepatitis C crónica subyace en su relación con la progresión de la enfermedad (231). Incluso antes de identificar al VHC como agente viral causante de las hepatitis no-A y no-B, se conocía que este agente patológico interaccionaba con lípidos y lipoproteínas. De hecho, la acumulación de lípidos neutros en gotas lipídicas citoplasmáticas en los hepatocitos fue definida como una característica patológica de la infección por VHC (232). Además, el grado de esteatosis se correlaciona con los niveles de ARN viral en hígado y suero de pacientes infectados (230).

La infección crónica con VHC está asociada a la desregulación de la homeostasis de lípidos, favoreciendo la acumulación de triglicéridos en el hígado, mediante la activación transcripcional de genes lipogénicos (7, 8). Distintos estudios han confirmado el papel de las proteínas core, NS2 y NS4B en la activación de SREBP y RXR (11, 118, 119, 233). Además, se ha visto que la expresión génica del VHC inhibe la transcripción de MTP, la enzima clave en la producción de VLDL, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual está asociado al desarrollo de esteatosis (234). La esteatosis no está sólo causada directamente por el VHC, sino que está ligada a la patogénesis y la progresión de la

45

enfermedad. Así, la infección crónica con el VHC está también muy asociada a la resistencia a la insulina, lo cual podría ser una consecuencia de la alteración de la señalización de insulina y la activación de marcadores inflamatorios como TNF α y las proteínas de la familia del supresor de la señalización de citoquinas (SOCS), lo que a su vez desregula la síntesis de ácidos grasos y conduce al desarrollo de esteatosis (235). En paralelo, el VHC incrementa la actividad de PPAR α y PPAR γ en los hepatocitos contribuyendo a la desregulación de la β -oxidación de ácidos grasos y de la sensibilidad a la insulina. Además, los genes del metabolismo lipídico, como SREBP, también resultan modificados por este mecanismo (7, 9).

La viremia del VHC está asociada a bajas concentraciones de colesterol y triglicéridos en plasma. De hecho, una concentración disminuida de triglicéridos puede desempeñar un papel clave en el agravamiento de la infección, ya que concentraciones elevadas de triglicéridos en plasma durante la fase aguda de la infección del VHC están asociadas a un aclaramiento espontáneo del VHC (236).

Varios estudios muestran una conexión entre el éxito del tratamiento antiviral y los parámetros lipídicos observados en el paciente. Tanto la esteatosis hepática como la resistencia a la insulina empeoran la respuesta al tratamiento de la hepatitis C (237, 238).

2.2.5. Diagnóstico

Generalmente, los pacientes con NAFLD son identificados mediante un análisis de sangre rutinario o imagen abdominal. La evaluación inicial incluye la exclusión de otras causas coexistentes como hepatitis autoinmunes, hemocromatosis hereditaria, hepatitis víricas, hepatitis tóxicas, deficiencia de α 1-antitripsina y enfermedad de Wilson.

Un título bajo de anticuerpo antinuclear, anticuerpo antiactina del músculo liso y anticuerpo antimitocondrial positivo es común en pacientes con NAFLD. Sin embargo, en aquellos pacientes que se sospeche que puedan tener NAFLD y sean anticuerpo antinuclear positivo a títulos mayores de 1 : 160 o antiactina de músculo liso positivo a títulos superiores de 1 : 40 se debe considerar la biopsia. La hiperferritinemia es considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico y se describe con frecuencia en pacientes con NAFLD. No obstante, en los pacientes que se sospeche que tengan NAFLD y presenten elevada ferretina en suero se recomiendan tests para detectar las mutaciones de las hemocromatosis hereditarias. En estos pacientes se podría hacer una biopsia hepática si son homozigotos o heterozigotos para la mutación C282Y (239).

Distinguir entre las formas alcohólica y no alcohólica puede ser difícil en pacientes con síndrome metabólico y un consumo regular de alcohol. El índice ALD/NAFLD consistente en el volumen corpuscular medio, AST, ALT, altura y peso podría ayudar a diferenciar las dos formas (240).

Los estudios radiológicos para el diagnóstico de esteatosis incluyen el uso de imágenes de ultrasonidos, tomografía computarizada y resonancia magnética, así como espectroscopía y elastografía de resonancia magnética. La elastografía de ultrasonidos se usa actualmente para el diagnóstico de fibrosis avanzada. Los ultrasonidos con Levovist podrían ser muy útiles para identificar pacientes con NASH (241).

2.2.6. Tratamiento

Se recomienda generalmente que los pacientes con sobrepeso y obesos, con NAFLD, pierdan el 7-10% de su peso corporal mediante la modificación de la dieta y la realización de ejercicio en el transcurso de 6-12 meses. Esto se basa en estudios a corto plazo que muestran que una pérdida gradual de peso de esta magnitud mejora la resistencia a la insulina y la histología hepática (242, 243). Se recomienda además comida baja en hidratos de carbono con pocas grasas saturadas y rica en ácidos grasos mono y poliinsaturados. También se deberían evitar dietas con alto porcentaje de fructosa (244). El Orlistat, un inhibidor reversible de las lipasas pancreática y gástrica, puede ser efectivo en promover una pequeña pérdida de peso, aunque no causa una pérdida de peso o una mejora histológica mayor de las que se logran con una restricción calórica únicamente (245). El Rimonabant, un antagonista del receptor 1 cannabinoide, estuvo aprobado en Europa para promover la pérdida de peso y tiene propiedades antiesteatósicas y antifibróticas (246, 247), pero se retiró del mercado tras la evidencia de estar asociado su uso con un incremento en el riesgo de tendencias suicidas y depresión (248).

Ya que muchos pacientes con NAFLD tienen obesidad, en las últimas décadas se han llevado a cabo procedimientos de cirugía bariátrica para tratar la obesidad y sus complicaciones con claros beneficios a corto y largo plazo (249, 250). Los procedimientos de cirugía bariátrica más comunes son el bypass gástrico de Roux en Y, la banda gástrica ajustable, la gastroplastia y la gastrectomía vertical (251). En general, la histología hepática mejora significativamente después de una cirugía bariátrica con un mínimo riesgo de empeoramiento, aunque ésta no está recomendada específicamente para tratar la NAFLD (252).

Debido a que la resistencia a la insulina está muy ligada a la esteatohepatitis, se han llevado a cabo estudios para tratar esta enfermedad con sensibilizantes a la insulina, entre los que destacan la metformina y las tiazolidinedionas (pioglitazona y rosiglitazona). Aunque el mecanismo de acción exacto de la metformina no está claro, ésta proporciona un evidente beneficio como agente antidiabético y como sensibilizante a la insulina. Su acción antidiabética está probablemente relacionada con una disminución de la gluconeogénesis hepática, un descenso de la absorción de glucosa y un incremento de la sensibilidad a la insulina facilitando la captación y utilización de glucosa (253). Las tiazolidinedionas (TZDs), son una clase de medicamentos antidiabéticos que mejoran la resistencia a la insulina actuando como agonistas selectivos de PPAR γ (254). Un tipo de tiazolidinediona, la troglitazona, fue retirada del mercado debido a su hepatotoxicidad, mientras que la rosiglitazona y la pioglitazona siguen disponibles actualmente para su uso clínico (255). Éstas redistribuyen la grasa desde el músculo e hígado al tejido adiposo mejorando así

la sensibilidad a la insulina en el músculo y en el hígado. Además, incrementan los niveles circulantes de adiponectina, la cual es producida exclusivamente en el tejido adiposo y actúa como sensibilizante a la insulina (254). En general, las TZDs mejoran la histología hepática en pacientes con NASH aunque su efecto favorable sobre la esteatosis es mucho más acusado que sobre otras variables histológicas como inflamación, balonización o fibrosis. Este efecto favorable sobre la histología y bioquímica hepática desaparece si se interrumpe el tratamiento, lo que sugiere la necesidad de mantener dicho tratamiento a largo plazo para mantener sus beneficios terapéuticos (256). Sin embargo, a largo

El receptor nuclear FXR (receptor X farnesoide) tiene un papel importante en la regulación de la homeostasis de colesterol y ácidos biliares, así como en el metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina. Un agonista del mismo, INT-747, incrementa la secreción de insulina y potencia el almacenamiento de lípidos en los adipocitos y la secreción de adiponectina y leptina (239). Otro agonista sintético de FXR, WAY-362450, es capaz de reducir la inflamación y la fibrosis en un modelo animal de NASH (258).

Existen también fármacos que reducen la cantidad de lípidos, como las estatinas, que inhiben la HMG-CoA reductasa, ya descritas anteriormente por su uso en el tratamiento de la hepatitis C; éstas han sido utilizadas sólo en algunos casos para el tratamiento de NAFLD (259, 260). En combinación con las estatinas o de manera individual también se usa el fenofibrato, un activador de PPARα, dando como resultado una mejora en el perfil lipídico en suero, reduciéndose la concentración de triglicéridos y aumentándose la de HDL (261). También tiene efectos antiinflamatorios y antitrombóticos (262) y mejora la sensibilidad a la insulina mediante la disminución de la acumulación lipídica en varios tejidos como el hígado o el músculo (263).

Existen agentes citoprotectores, como el ácido ursodesoxicólico y la pentoxifilina, que poseen propiedades hepatoprotectoras. La administración de

49

pentoxifilina mejora la actividad enzimática del hígado, la esteatosis y la inflamación probablemente inhibiendo TNF α (264). El ácido ursodesoxicólico es mejor tolerado por lo pacientes que la pentoxifilina aunque sólo provoca una disminución de los niveles de AST, sin ninguna mejora histológica (265).

Una elevada actividad del sistema renina-angiotensina podría jugar un papel importante en la patogénesis de NAFLD (266). Por ello, se han llevado a cabo estudios con bloqueantes de los receptores de angiotensina, como el telmisartán y el losartán, observándose mejoras en aspectos como la esteatosis, la fibrosis, la inflamación y la alteración del metabolismo lipídico (267, 268). Este mismo tipo de mejoras han sido observadas en pacientes tras la administración de L-carnitina, la cual está involucrada en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria para su oxidación (269).

Ya que el estrés oxidativo contribuye en gran medida en la patogénesis de NAFLD se han probado una serie de terapias basadas en antioxidantes, como las vitaminas E o C (270) o derivados de vegetales como el resveratrol (271) o el extracto de té verde (272). La S-alilmercaptocisteína, presente en el ajo, también tiene efectos beneficiosos sobre la enfermedad (273).

La NAFLD está asociada también a una permeabilidad aumentada del intestino, lo que está a su vez relacionado con el exceso de crecimiento bacteriano en el intestino delgado (274). Así, se ha visto que un tratamiento con probióticos puede mejorar el daño hepático propio de NAFLD (275); los probióticos evitan la proliferación de bacterias perjudiciales y el exceso de crecimiento bacteriano en el intestino delgado, restauran la barrera gastrointestinal y modulan el sistema inmune (276).

50

2.2.7. Modelos de estudio in vitro e in vivo de la esteatosis

Se han desarrollado numerosos modelos de NAFLD, principalmente animales y en especial roedores, y en menor medida cultivos celulares, para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el inicio y progresión de esta enfermedad hepática. Sin embargo, estos modelos sólo "mimetizan" ciertos aspectos característicos de la enfermedad en humanos y difieren de ésta sobre todo en el grado de daño hepatocelular y en las alteraciones metabólicas asociadas al desarrollo de la enfermedad (277).

Un modelo animal ideal para el estudio de la NAFLD debería reflejar la histopatología y la fisiopatología hepáticas de la NAFLD humana. Así, en el hígado se debería desarrollar esteatosis, inflamación intralobular, balonización e, idealmente, fibrosis perisinusoidal en zona 3 y susceptibilidad al desarrollo de tumores. Además, los animales deberían presentar anomalías metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina, hiperglucemia en ayuno, dislipidemia, un perfil alterado de adipoquinas y concentraciones elevadas de endotoxinas bacterianas (170).

Los modelos genéticos más utilizados son aquellos que presentan alteraciones en el comportamiento alimentario, que normalmente resulta de defectos en la vía de señalización de la leptina. Así, los ratones ob/ob portan mutaciones en el gen de la leptina, dando lugar a una deficiencia en leptina y una subsecuente hiperfagia, inactividad, obesidad y diabetes que acompañan al desarrollo de NAFLD. Este modelo se usa para el estudio de varias enfermedades metabólicas, entre ellas NAFLD, a pesar de que la mutación en *ob* es rara en humanos (278). Sin embargo, en estos ratones no hay una progresión espontánea de esteatosis a esteatohepatitis y requieren para ello algún otro tipo de alteración, como una dieta deficiente en metionina y colina, una dieta rica en grasas o pequeñas dosis de endotoxinas (170). Otros modelos con características similares a los ratones ob/ob son los ratones db/db, mutados en el gen del receptor de la leptina (*ob-Rb*) (279), las ratas Zucker obesas (fa/fa), que desarrollan también esteatosis debido a la falta del receptor de la leptina (280) o los ratones KK-Ay con el gen *agouti* mutado, lo cual provoca en ellos una pérdida de melanocortina y una alteración de la supresión del apetito, conduciendo también a un fenotipo obeso. Un factor que juega un papel importante en la regulación de la ingesta de comida y del peso corporal es el receptor 4 de melanocortina (MC4R). De hecho, en casos de obesidad temprana en humanos se han identificado varias mutaciones en este receptor (281). Así, ratones que no expresan MC4R desarrollan obesidad con hiperfagia, hiperinsulinemia e hiperglicemia y tras su alimentación con una dieta rica en grasas muestran una gran esteatosis y la alteración de los genes del metabolismo lipídico; además, tras un largo periodo de tiempo alimentados con esta dieta, se puede observar un progreso de esteatosis a esteatohepatitis e incluso a fibrosis y a carcinoma hepatocelular (282). Existen muchos otros tipos de modelos genéticos para el estudio de NAFLD como ratones que sobreexpresan SREBP-1c (283) u otros que no expresan PTEN (284), PPARα (285), AOX (286) o MAT1A (metionina adenosiltransferasa-1A) (287).

Uno de los modelos nutricionales más utilizado en el estudio de NAFLD es aquel basado en una dieta deficiente en metionina y colina (MCD). Los roedores alimentados con una dieta MCD desarrollan rápidamente esteatosis debido al incremento de la captación de ácidos grasos y a la disminución tanto de la β-oxidación como de la secreción de VLDL desde el hígado (288). Tras dos semanas con la dieta MCD aparece necrosis e inflamación seguidas de fibrosis. También contribuyen al daño hepático la presencia de estrés oxidativo (289), la activación de la vía de señalización de TLR4 (receptor 4 tipo Toll) y cambios en el perfil de citoquinas y adipocitoquinas (290). Sin embargo, este modelo tiene algunas limitaciones, como la ausencia de características tan importantes en el desarrollo de NAFLD en humanos como es la resistencia a la insulina o el sobrepeso, produciéndose, de hecho, una pérdida considerable del peso corporal del animal (291). Además, existen variaciones en la sensibilidad hacia la dieta MCD dependiendo del género, la especie y la cepa del animal (292).

Otro modelo nutricional consiste en la alimentación de roedores con una dieta rica en grasa. Estos animales muestran obesidad, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, incremento de la expresión de los genes reguladores de la lipogénesis como SREBP-1c y LXR, así como de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, no presentan un daño hepático tan pronunciado como en el caso del modelo MCD y además se necesitan tiempos más prolongados de alimentación para inducir un daño hepático severo, si bien las alteraciones moleculares y patológicas encontradas se parecen más a aquellas presentes en humanos con NAFLD. Por ello, este modelo se suele combinar con modelos genéticos de NAFLD (170).

Las dietas ricas en azúcar pueden suponer un factor de riesgo para el desarrollo de NAFLD en humanos (293). Así, las dietas ricas en carbohidratos también han sido usadas para inducir el desarrollo de NAFLD en ratones. De entre diferentes tipos de carbohidratos, la fructosa parece tener el efecto más perjudicial para el hígado pero con la menor ganancia de peso. La fructosa además provoca resistencia a la insulina, estrés oxidativo, expresión de citoquinas proinflamatorias, aumento de la expresión de SREBP-1c, niveles elevados de endotoxinas en la sangre portal y alteración de la expresión de adipocitoquinas. Al igual que ocurre en el caso del modelo anterior, estos ratones alimentados con altas concentraciones de fructosa no presentan un daño hepático de la misma magnitud que aquel presente en los ratones con la dieta MCD, pero las alteraciones patológicas y moleculares se asemejan más a aquellas encontradas en humanos con NAFLD (294, 295).

En otros modelos de ratones, una combinación de una dieta rica en grasa con concentraciones elevadas de fructosa, típica de una dieta de los países occidentales, conduce al desarrollo de NAFLD. Los ratones de este modelo muestran sobrepeso, resistencia a la insulina, NASH y fibrosis, así como estrés del retículo endoplasmático, lipoapoptosis, sobrecarga de hierro en el hígado y una elevada peroxidación lipídica, características de NAFLD en humanos (296, 297).

53

Además de éstos, existen diversos modelos que no implican el uso de roedores para el estudio de NAFLD (298, 299).

En cuanto a los modelos in vitro, mientras que para el estudio de otras enfermedades hepáticas suponen una importante herramienta, para el estudio de NAFLD se han obtenido muy pocos datos derivados de su utilización. En este tipo de modelos se han usado tanto cultivos celulares primarios como líneas celulares inmortalizadas para investigar los mecanismos moleculares implicados en la progresión de NAFLD. Los modelos más relevantes son aquellos basados en el cultivo de hepatocitos humanos primarios, células de Kupffer, células estrelladas o células endoteliales sinusoidales. Sin embargo, existe una limitación en cuanto a la disponibilidad de muestras de hígado humano, que junto con ciertos aspectos éticos, complican el uso de cultivos celulares primarios humanos. Por ello, es más frecuente el uso de cultivos primarios de células de roedores que, dependiendo del modelo utilizado, puede semejarse más o menos a las características que se dan en humanos. Una alternativa a los cultivos primarios son las líneas celulares inmortalizadas, cuyo cultivo es más simple y fácil de estandarizar, aunque presentan alteraciones en la expresión de varias enzimas y factores nucleares. Algunas de estas líneas celulares utilizadas para el estudio de NAFLD son RAW 264.7, AML-12, J774A, HepG2, Huh7, H4IIE, H4IIEC3, PAV-1 o LX2. Se pueden llevar a cabo también co-cultivos, combinando varios tipos celulares como por ejemplo los macrófagos RAW 264.7 y los hepatocitos de ratón AML-12, expuestos a fructosa y endotoxinas o modelos tridimensionales (277).

2.3. Flavonoides

2.3.1. Introducción

Los flavonoides son una familia de componentes presentes en las plantas, que tienen una estructura similar, una molécula con tres anillos a la que pueden estar unidos diferentes grupos, lo que determina la subclase de flavonoide y el componente concreto dentro de esta subclase. Las seis subclases de flavonoides son: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y antocianidinas. A su vez los flavonoides pueden presentarse como glicósidos (unidos a grupos glicosil) o como agliconas (sin grupos glicosil unidos) (300).

Las dietas ricas en flavonoides están asociadas con una baja incidencia de enfermedades crónicas como diabetes de tipo II, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas y cáncer (301).

2.3.2. Quercetina

La quercetina es un flavonoide, perteneciente a la subclase de los flavonoles. Éstos están presentes en una gran variedad de frutas y verduras. En los países occidentales se estima que la ingesta diaria de flavonoles es de 10-20 mg al día, y la mayoría se consumen en forma de glicósidos de quercetina, kaempferol y miricetina, más que en sus formas agliconas (302).

Todos los flavonoles tienen en común un esqueleto 3-hidroxiflavona, y se diferencian en la localización de los diferentes grupos OH fenólicos. Así, la quercetina presenta grupos OH en las posiciones 5, 7, 3' y 4' además de en la posición 3 propia de todos los flavonoles (Figura 8).



Figura 8. (A) Esqueleto 3-hidroxiflavona con localizaciones numeradas para la unión de grupos glicosil e hidroxil. (B) Estructura química de la quercetina.

Por definición, la quercetina es una aglicona, ya que no presenta ningún grupo glicosil unido. Tiene un color amarillo brillante y es totalmente insoluble en agua fría, un poco soluble en agua caliente y bastante soluble en alcohol y lípidos. La unión de un grupo glicosil, reemplazando un grupo hidroxilo, puede cambiar su solubilidad, absorción y efectos *in vivo*. Normalmente, la forma glicósido tiene mayor solubilidad en agua que la quercetina aglicona (303). En función del grupo glicosil unido, la quercetina recibe diferentes nombres (hiperósido, isoquercetina, rutina, etc.).

Los flavonoles de tipo quercetina se encuentran en manzanas, bayas, alcaparras, uvas, cebollas, chalotas, té, tomates, muchas semillas, nueces, flores, cortezas y hojas. También se encuentra en plantas medicinales como el *Ginkgo biloba, Hypericum perforatum* y *Sambucus canadensis*. La mayoría de los flavonoles tipo quercetina que se consumen a diario son en forma de glicósidos. Los más comunes son quercetina con una o dos moléculas de glucosa y quercetina unida a rutinosa (304, 305). Dos de las mejores fuentes de quercetina son cebollas y chalotas y dependiendo qué parte de las mismas, tienen mayor o menor contenido de quercetina y diferentes formas de ésta. Así, la pulpa de las chalotas tiene un 99,2 % de quercetina en forma de glicósido y un 0,8 % en forma de aglicona; sin embargo, en la piel seca predomina la forma aglicona (83,4 %) (306). Lo mismo ocurre en el caso de las cebollas, donde sólo en las capas más externas y la piel predomina la forma aglicona (307).

Los factores que más influyen en la absorción de la quercetina son el tipo de glicósido unido y la solubilidad, modificada por etanol, lípidos y emulsionantes (308). Cuando se ingiere la forma glicósido, los grupos glicosil se liberan durante la masticación, digestión y absorción. Las enzimas de la boca y el intestino, así como las bacterias presentes en los mismos, son capaces de hidrolizar los glicósidos a agliconas (309). En humanos, la quercetina en su forma aglicona parece estar más biodisponible que en su forma glicósido (306).

La quercetina parece tener muchos efectos beneficiosos sobre la salud humana. En animales se ha visto que tiene un gran potencial antioxidante, protegiendo a diversos tejidos y órganos como el corazón o el cerebro frente al daño producido por el fenómeno de isquemia-reperfusión, por componentes tóxicos y por otros factores que pueden inducir estrés oxidativo (310-312). Sin embargo, puede también presentar actividad pro-oxidante bajo algunas circunstancias (313). La actividad antioxidante de la guercetina no ha sido observada en la mayoría de estudios llevados a cabo en humanos (314, 315). La quercetina parece tener efectos antialergénico (316) y antiasmático (317). Puede disminuir además el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (318, 319), así como la presión arterial (320, 321), probablemente debido a la mejora de la función endotelial al aumentar la concentración de óxido nítrico y reducir las concentraciones de endotelina-1 (322). Este flavonol tiene también efectos antinociceptivo (323) y antiinflamatorio (324), aunque no se ha visto dicho efecto en humanos (315, 321, 325). En modelos animales se ha visto que la guercetina puede ser beneficiosa en el tratamiento de la diabetes (326, 327) y de la obesidad (18, 328) y tiene también efectos de tipo ansiolítico y antidepresivo (329). Numerosos estudios in vitro sugieren que este flavonoide tiene un papel anticancerígeno gracias a su actividad como antioxidante, antiproliferativo, proapoptótico y supresor de factores de crecimiento, así como por mostrar un gran sinergismo con algunos agentes quimioterapéuticos (330, 331). Además, en estudios llevados a cabo en animales se ha visto que la guercetina es capaz de inhibir el crecimiento de tumores (332). También presenta actividad antiviral (17, 333) y antibacteriana (334).

En humanos está descrito que la quercetina es en general bien tolerada y dosis de hasta 1 g por día durante meses no produce efectos adversos, salvo en algún caso como en combinación con el fármaco digoxina, con el que puede presentar efectos letales (335). También modifica la biodisponibilidad de otros fármacos debido principalmente a su efecto de inhibición sobre CYP3A4 y sobre el transportador de fármacos glicoproteína P (336).

2.3.3. Flavonoides en el tratamiento de la hepatitis C

Se ha observado que la quercetina muestra una actividad antiviral frente al VHC (15), mostrando una fuerte reducción de la producción de partículas infecciosas a dosis de 33 y 50 μ M, sin modificar sustancialmente la replicación del virus. La quercetina es capaz de inhibir la actividad de la proteína NS3 (16),

así como de reducir la actividad del IRES e inhibir la síntesis de las proteínas de choque térmico HSP40 y HSP70, las cuales interactúan con la proteína NS5A del virus. Sin embargo, el silenciamiento de las proteínas HSP mediante ARNs pequeños de interferencia (*siRNA*) no tiene efecto sobre la producción de partículas virales, por lo que el mecanismo de acción anti-VHC de la quercetina a las concentraciones testadas podría deberse más bien a la alteración de la morfogénesis viral o del proceso de secreción de partículas (17).

Además de la quercetina, existen otros tipos de flavonoides descritos como potenciales moléculas anti-VHC. La silimarina es un componente extraído del cardo *Silybum marianum* que contiene al menos siete flavonolignanos (silibina A, silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silicristina, isosilicristina, silidianina) y un flavonoide (taxifolina). La silimarina tiene múltiples efectos sobre el VHC. Parece inhibir la replicación del VHC en cultivo celular y presenta actividades antiinflamatorias e inmunomoduladoras que pueden contribuir a sus efectos hepatoprotectores (337). La inhibición de la replicación del VHC parece atribuirse a la acción inhibidora de la silibinina (silibina A y silibina B) sobre la proteína NS5B, que también parece inhibir la entrada del virus en la célula y bloquear la propagación del virus de célula a célula (338), así como la expresión de la proteína core (339).

La epigalocatequina-3-galato es el flavonoide más abundante de la subclase de las catequinas (flavanoles) presente en el extracto de té verde. Este componente actúa inhibiendo la entrada del virus de la hepatitis C de una manera dependiente de la dosis (150, 340) y podría también inhibir las actividades de NS3 y NS5B (341, 342), así como la replicación viral (340).

La flavona ladaneina, y su derivado sintético BJ486K, son capaces también de evitar la entrada del virus (343).

Una flavanona presente en el pomelo, la naringenina, posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas tanto *in vitro* como *in vivo* y

es también capaz de disminuir la producción de partículas de VHC. Este efecto de la naringenina podría estar mediado en parte por la activación de PPARα y la inhibición de la producción de VLDL, dada la estrecha relación entre el ensamblaje y secreción de partículas virales y el metabolismo de lipoproteínas (149).

La luteolina y la apigenina son dos flavonas que muestran también actividad anti-VHC, siendo ambas buenos inhibidores de la actividad de la proteína NS5B (344).

La curcumina es un polifenol obtenido de la planta *Curcuma longa* que presenta numerosos efectos beneficiosos al presentar actividades antioxidante, anti-inflamatoria, anticarcinogénica, hipocolesterolémica, antibacteriana, antiespasmódica, anticoagulante y hepatoprotectora (345). Se sabe que tiene también actividad frente al virus de la influenza, adenovirus, coxsackievirus y VIH y parece que inhibe la expresión génica del VHC vía supresión de la activación de AKT-SREBP-1. Su combinación con IFN α produce una gran inhibición de la replicación de este virus (346).

2.3.4. Flavonoides en el tratamiento de la esteatosis

Se ha demostrado que la quercetina es capaz de reducir la acumulación de grasa en el hígado y mejorar los parámetros relacionados con el síndrome metabólico en ratones alimentados con una dieta típica de los países más occidentales. Este efecto puede deberse a la disminución tanto del estrés oxidativo como de la expresión de genes relacionados con el desarrollo de esteatosis (18). También podría mejorar la respuesta a la glucosa y la resistencia a la insulina asociada a la diabetes de tipo II, atenuando la desregulación del metabolismo de ácidos grasos libres, mediante la supresión del estrés oxidativo, aumentando la captación de la glucosa por los tejidos periféricos y disminuyendo la expresión de los genes inflamatorios en el hígado (347). En hepatocitos de rata se ha visto que la quercetina es capaz de disminuir la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos (348).

Se ha comprobado que la silimarina es capaz de reducir las concentraciones de triglicéridos y de ALT en modelos animales de NAFLD (349) y mejorar de manera significativa, en combinación con vitamina E y fosfolípidos, los niveles de enzimas hepáticas, la hiperinsulinemia y el índice de fibrosis hepática en pacientes con NAFLD (350).

En animales se ha visto que la curcumina es capaz de mejorar la histología típica de NAFLD, probablemente al reducir la transcripción génica de TNF α , NF- κ B y HMG-CoA. Es capaz de reducir la concentración de LDL en suero al incrementar la expresión de los receptores de LDL, bloquear la oxidación de LDL, aumentar la secreción de ácidos biliares y disminuir la expresión de genes involucrados en la síntesis de colesterol, protegiendo también frente al daño hepático y la fibrogénesis (351, 352).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

3.1.1. Líneas celulares

Para la realización del presente trabajo se utilizaron dos modelos *in vitro* de hepatitis C diferentes.

El primero de ellos se basa en la utilización de células Chang liver (CCL-13, ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), línea celular inmortalizada y carente de malignidad, ampliamente utilizada en estudios de función hepática. Dichas células fueron transfectadas de forma estable con el gen que codifica para la proteína estructural core (CHL-core) o con el gen que codifica para la proteína no estructural NS5A (CHL-NS5A) del VHC. Para la obtención de los clones transfectados CHL-core y CHL-NS5A se utilizaron como vectores de expresión pEF1 α y pcDNA3.1, respectivamente. El plásmido pEF-core se obtuvo subclonando dentro de pEF1α (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) un fragmento de PCR que contiene la secuencia completa del gen que codifica para la proteína core del genotipo 1b del VHC, mientras que el plásmido pcDNA3.1-NS5A se generó subclonando dentro de pcDNA3.1 (Invitrogen™) un fragmento de PCR que contiene la secuencia completa del gen que codifica para la proteína NS5A. Como células control se procedió a la transfección de las células Chang liver con los vectores vacíos (pEF1 α y pcDNA3.1, respectivamente) (CHL). La selección de los clones transfectados se llevó a cabo en presencia de 0,5 mg/mL de antibiótico G-418 (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.). La expresión del gen de la proteína core y NS5A en dichas células se confirmó mediante técnicas de western blot y RT-PCR. Las células Chang liver así transfectadas fueron cedidas por el grupo del Dr. Carmelo García-Monzón, del Hospital Universitario Santa Cristina de Madrid.

El segundo modelo consiste en la utilización de células Huh7, línea celular establecida derivada de hepatoma humano, que incluyen el replicón genómico completo del genotipo 1b del virus de la hepatitis C (VHC-G1). Como control se utilizó el mismo clon tratado con IFNα-2b (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ,

EE.UU.) (Huh7). Estas células fueron cedidas por el grupo del Dr. Ricardo Moreno-Otero, del Hospital Universitario de la Princesa de Madrid.

3.1.2. Condiciones de cultivo

Las células Chang Liver y Huh7, así como las líneas derivadas de las mismas, se cultivaron en condiciones controladas de temperatura (37°C), con un 5% de CO₂ y 95% de humedad, en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), 10 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina y glutamina al 1% (Gibco[®]) (medio completo). La selección de las células transfectadas se llevó a cabo en presencia de 0,5 mg/ml de antibiótico G-418 (Promega Corporation). Con el fin de evitar cambios fenotípicos, las células fueron usadas sólo durante 8-10 semanas, procediéndose entonces a descongelar pases iniciales.

3.2. Tratamientos

3.2.1. Silenciamiento de LXRa mediante siRNA

Con el fin de comprobar el efecto de la inhibición de la expresión de LXR α en el metabolismo lipídico y en la replicación del VHC se silenció dicho gen, para lo cual se utilizó un *siRNA* específico para LXR α y un control negativo *siRNA* (Ambion[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), ambos a una concentración de 10 nM. La transfección reversa de las células VHC-G1 con los *siRNA* se llevó a cabo según el protocolo proporcionado por el fabricante. Primeramente, en una placa de 6 pocillos se mezclaron 295 µl de medio bajo en suero *OPTI-MEM*[®] *I* (Gibco[®]) con 5 µl de *siPORT* (Ambion[®]), y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió una mezcla de 285 µl del mismo medio bajo en suero y 15 µl de *siRNA* específico para el LXR α (2 µM) o de *siRNA* control negativo (2 µM) y se llevó a cabo otra incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron las células resuspendidas en 2,4 ml de medio sin antibiótico (2,0 x 10⁵ células/pocillo). A las 30 h se sustituyó dicho medio por el medio de cultivo habitual y tras 48 horas se procedió a la recogida de las células para su análisis.

3.2.2. Inducción de LXRa mediante el agonista GW3965

Para comprobar el efecto de la inducción de la expresión de LXRα en el metabolismo lipídico y en la replicación del VHC se indujo la expresión del mismo y su actividad transcripcional mediante el agonista de LXRα GW3965 (GlaxoSmithKline, Cambridge, Reino Unido). Para ello, las células VHC-G1 se cultivaron en medio sin suero y con el ligando GW3965 (5 µM) durante 24 horas, tras lo cual se recogieron para su análisis.

3.2.3. Inhibición de la fosforilación de AKT

La posible implicación de la vía PI3K/AKT en la activación de LXR α asociada a la expresión de las proteínas virales y a la replicación viral, se comprobó mediante la inhibición de la vía de señalización de la PI3K con el inhibidor LY294002 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido). Para ello, las células se incubaron durante 24 horas con el inhibidor a una concentración de 50 μ M. Transcurrido dicho periodo de incubación, las células se recogieron con el fin de realizar las determinaciones oportunas. Asimismo, en un experimento independiente, se investigó en las células VHC-G1 el papel de la inhibición de la fosforilación del AKT seguido de un tratamiento con quercetina sobre la replicación del VHC, la expresión de LXR α y el acúmulo lipídico intracelular. En este caso, el pre-tratamiento con el inhibidor LY294002 fue de 8 horas, seguido del tratamiento con o sin quercetina o IFN α -2b durante 48 horas. En todos los casos, el vehículo usado para los tratamientos fue DMSO (0,05%). Las células control se incubaron con la misma concentración de DMSO.

3.2.4. Tratamiento con flavonoides e IFNα-2b

Las células VHC-G1 se trataron con los flavonoles quercetina y kaempferol, con la flavanona taxifolina y con la flavona apigenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) a concentraciones de 0,1, 1 y 5 μ M durante 48 horas para evaluar su potencial como inhibidores de la replicación del VHC. Posteriormente, para analizar los mecanismos moleculares involucrados en la inhibición de la replicación del virus por la quercetina, las células se trataron con dicho flavonoide a concentraciones de 0,1, 0,5, 1 y 5 μ M con o sin IFN α -2b a una concentración de 0,5 U/ml durante 48 horas. Como control de la inhibición de la replicación las células se trataron con IFN α -2b a una concentración de 50 U/ml.

Como se comentó anteriormente, el vehículo usado para los tratamientos fue DMSO (0,05%). Las células control se incubaron con la misma concentración de DMSO.

3.2.5. Inducción de la expresión de LXR mediante vectores adenovirales

Con el fin de establecer el efecto de la quercetina y el IFN α -2b sobre la sobreexpresión de LXR α y sobre el subsiguiente incremento del acúmulo lipídico intracelular, se utilizó un modelo de sobreexpresión mediante la infección de las células Huh7 con un vector adenoviral conteniendo el gen LXR α .

El ADNc de LXRα, proporcionado por el Dr. D. Mangelsdorf (UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, EE.UU.), se liberó del plásmido pCMX con las enzimas KpnI-BamHI, y se subclonó en el vector pAC/CMVpLpA, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Este plásmido, junto con el plásmido pJM17, se co-transfectaron en células 293 para permitir la recombinación homóloga y generar los adenovirus Ad-LXRα. Éstos, junto con los adenovirus que contienen un plásmido sin gen (Ad-CONT) fueron cedidos por el grupo del Dr. Ramiro Jover del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Las células Huh7 se infectaron con los adenovirus que expresaban el factor de transcripción (Ad-LXR α) o con el adenovirus control (Ad-CONT), durante 24 horas y con una multiplicidad de infección de entre 15 y 30 unidades formadoras de placa/célula. Transcurrido este tiempo se añadió el ligando de LXR α T0901317 (Sigma-Aldrich) y 48 horas después de la infección las células se trataron con quercetina (0,1-5 μ M) o IFN α -2b (0,5 y 50 U/ml).

3.3. Determinaciones analíticas

3.3.1. Viabilidad celular

Fundamento

Para comprobar el efecto de los distintos tratamientos sobre la viabilidad celular, se utilizó el método de Denizot y Lang (353), basado en la capacidad de las deshidrogenasas de las células viables para hidrolizar el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich), dando lugar a cristales de formazán de color púrpura, el cual puede ser solubilizado y cuantificado mediante espectrofotometría a λ =560 nm.

Procedimiento

Las células se cultivaron y trataron en placas de 24 pocillos tras lo cual se aspiró el medio, se lavó con PBS 1X y se añadió a cada pocillo 1ml de medio sin suero y 100 µl del MTT disuelto en PBS 1X a 5 mg/ml, sonicado previamente durante 5 minutos. Se incubó durante 3 horas, a 37°C y un 5% de CO₂. A continuación, se retiró el medio con el MTT y se añadió 1 ml de DMSO por pocillo. Se agitó en vórtex para disolver el precipitado y se leyó la absorbancia a 560 nm en el lector de placas Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.). Por último, la viabilidad se calculó a partir de la absorbancia por comparación con las células control (100% de viabilidad).

3.3.2. Cuantificación de triglicéridos

El contenido intracelular de triglicéridos se evaluó mediante el kit *Triglyceride Quantification* (BioVision Research Products, Mountain View, CA, EE.UU.) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

Fundamento

Los triglicéridos son convertidos en ácidos grasos y glicerol. El glicerol posteriormente es oxidado para generar un producto que reacciona con la sonda dando lugar a la formación de un compuesto coloreado que se puede detectar mediante espectofotometría a λ =570 nm.

Procedimiento

Primeramente se realizó una recta estándar. Para ello, se diluyeron 40 μ l del estándar de triglicéridos 1 mM en 160 μ l de tampón (*Triglyceride Assay Buffer*) para generar un estándar de concentración 0,2 mM. En una placa de 96 pocillos se añadieron por pocillo 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μ l del estándar 0,2 mM. Se ajustó el volumen de cada pocillo a 50 μ l mediante la adición de tampón, generando 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol/pocillo del estándar de triglicéridos.

La preparación de las muestras se llevó a cabo mediante la homogeneización de 10 millones de células en 1 ml de agua con NP-40 (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA, EE.UU.) al 5%. Las muestras se calentaron a 100°C en un baño de agua durante 5 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, repitiéndose de nuevo la misma operación para la completa solubilización de todos los triglicéridos. Posteriormente, se centrifugaron 2 minutos a la máxima velocidad para eliminar cualquier material insoluble. En la placa de 96 pocillos, se añadieron las muestras a distintas diluciones ajustando el volumen a 50 µl/pocillo por adición de tampón.

A continuación se añadieron 2 μ l de lipasa a cada pocillo conteniendo el estándar o las muestras a diferentes concentraciones y se llevó a cabo una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la conversión de los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos.

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo para cada pocillo 46 μ l de tampón, 2 μ l de sonda y 2 μ l de enzima. Tras la adición de los 50 μ l de la mezcla de reacción por cada pocillo se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Por último, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Synergy HT (BioTek) y se calculó el contenido de triglicéridos en las muestras por comparación con la recta patrón.

68

3.3.3. Cuantificación de ácidos grasos libres

El contenido intracelular de ácidos grasos libres se evaluó mediante el kit *Free Fatty Acid Quantification* (BioVision Research Products) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante.

Fundamento

Los ácidos grasos son convertidos en sus derivados CoA, los cuales son posteriormente oxidados generando un compuesto coloreado que puede ser detectado mediante espectofotometría a λ =570 nm.

Procedimiento

Primeramente se llevó a cabo una recta estándar. Para ello, en una placa de 96 pocillos se añadieron por pocillo 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µl del estándar de ácido palmítico 1 nmol/µl y se ajustó el volumen de cada pocillo a 50 µl mediante la adición de tampón (*Fatty Acid Assay Buffer*), generando 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol/pocillo del estándar de ácido palmítico.

La preparación de las muestras se llevó a cabo mediante la homogeneización de 1 millón de células en 200 μ l de cloroformo con Tritón X-100 (Merck Millipore) al 1%. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a la máxima velocidad y se recogió la fase orgánica, que se calentó posteriormente a 50°C hasta la total evaporación del cloroformo. Los lípidos se resuspendieron en 200 μ l de tampón vorteando durante 5 minutos. En la placa de 96 pocillos, se añadieron las muestras a distintas diluciones ajustando el volumen a 50 μ l/pocillo por adición de tampón.

A continuación se añadieron 2 μl del reactivo ACS (Acil-CoA sintetasa) a cada pocillo conteniendo el estándar o las muestras a diferentes concentraciones y se llevó a cabo una incubación de 30 minutos a 37°C.

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo para cada pocillo 44 μ l de tampón, 2 μ l de sonda, 2 μ l de enzima y 2 μ l de un potenciador. Tras la adición

de los 50 μ l de la mezcla de reacción por cada pocillo se incubó durante 30 minutos a 37°C y en oscuridad.

Por último, se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Synergy HT (BioTek) y se calculó el contenido de triglicéridos en las muestras por comparación con la recta patrón.

3.3.4. Citometría de flujo

La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs), la peroxidación lipídica, así como el acúmulo intracelular de lípidos se evaluaron mediante citometría de flujo.

La producción de EROs y ERNs se analizó gracias a la fluorescencia de la 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) y del etidio (ETH), productos de la oxidación del DCFH-DA (Sigma-Aldrich) y del DHE (Molecular Probes[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) con sensibilidad por los radicales derivados del H₂O₂/NO y por el anión superóxido (O₂⁻), respectivamente.

El contenido lipídico y la peroxidación lipídica se analizaron utilizando Rojo Nilo (Sigma-Aldrich) o Bodipy 493/503 y Bodipy 581/591 C_{11} (InvitrogenTM), respectivamente.

Para ello, se procedió a la recogida de las células mediante tripsinización y tras un lavado con PBS 1X el pellet se resuspendió con el correspondiente fluoróforo (5 μ M para DCFH-DA y DHE o 1 μ g/ml para Rojo Nilo, Bodipy 493/503 y Bodipy 581/591 C₁₁, en PBS 1X), durante 15 minutos a 37°C en condiciones de agitación y oscuridad. Transcurrido dicho tiempo, la células se lavaron y resuspendieron en PBS 1X para su análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.).

La fluorescencia de DCF (canal FL-1), ETH (canal FL-2), Rojo Nilo (canal FL-2), Bodipy 493/503 (FL-1) y Bodipy 581/591 C_{11} (FL-2) correspondiente a 10.000 células se cuantificó mediante el software *CellQuest* (Becton Dickinson), siendo la

intensidad de fluorescencia emitida por las células, proporcional a su contenido de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, de lípidos intracelulares o peroxidación lipídica, respectivamente.

3.3.5. Microscopía de fluorescencia

Los resultados de citometría de flujo sobre la acumulación intracelular de lípidos se corroboraron mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, las células en cultivo se lavaron con PBS 1X y se fijaron con una solución de paraformaldehido al 3,7% en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las células se lavaron de nuevo y se incubaron con Rojo Nilo o Bodipy 493/503 a una concentración de 1 µg/ml en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Con el fin de estudiar la localización de LXRα y las proteínas del VHC se llevó a cabo la doble tinción de LXRα y core o NS5A en células VHC-G1. Éstas se cultivaron, se lavaron con PBS 1X y se fijaron con una solución de paraformaldehido al 3,7% en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las células se lavaron de nuevo y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% en PBS 1X durante 20 minutos. Después se incubaron con los anticuerpos de conejo anti-LXRα (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y de ratón anti-core (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) o anti-NS5A (Virostat, Portland, ME, EE.UU.) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos secundarios de burro anticonejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, EE.UU.) o anti-ratón conjugado con Texas Red (Jackson ImmunoResearch) durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

Después del marcaje de los lípidos o de la proteínas correspondientes, las preparaciones se incubaron durante 1 minuto con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para la tinción de los núcleos, tras lo cual se lavaron con PBS 1X y se montaron con medio de montaje *DakoCytomation Flourescent* (DAKO, Glostrup, Dinamarca) para su observación mediante un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse Ti-U, Melville, NY, EE.UU.).

3.3.6. Extracción de ARN

Fundamento

Para la extracción del ARN total, se siguió una modificación del protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi (354). Para ello se utilizó el reactivo *TRI Reagent® Solution* (Ambion®), solución monofásica formada por una mezcla de fenol y tiocianato de guanidina, que mantiene la integridad del ARN, si bien provoca la ruptura celular y disuelve todos los componentes celulares.

Procedimiento

Una vez aspirado el medio de los frascos de cultivo, se añadieron 3 ml de *TRI Reagent® Solution* por cada frasco (de 75 cm² de superficie), se rascó la superficie y se recogieron las células en tubos eppendorf estériles. Por cada ml de *TRI Reagent® Solution* se añadieron 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente en vórtex durante 15 segundos. Tras una incubación a temperatura ambiente de 15 minutos, se centrifugaron las muestras a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa, donde se encuentra el ARN, en tubos eppendorf estériles, se añadieron 500 µl de isopropanol y se agitó en vórtex a velocidad moderada durante 15 segundos. Las muestras se incubaron 20 minutos a 4°C. Una vez centrifugadas, se desechó el sobrenadante y se resuspendió y lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75%, preparado con agua DEPC (Ambion®). Se volvió a centrifugar a 7.500 xg durante 5 minutos a 4°C y se retiró el etanol, tras lo cual se resuspendió el pellet en 50 µl de agua DEPC y finalmente se congeló a -80°C para su posterior cuantificación.

3.3.7. Cuantificación de ARN

El ARN obtenido se cuantificó midiendo la densidad óptica (DO) a 260 nm con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE, EE.UU.) (1 unidad de DO equivale a 40 μg/ml de ARN). La pureza del ARN se comprobó mediante la relación DO 260/280 debiendo encontrarse dicho valor dentro del intervalo 1,7 < DO < 2.

3.3.8. Tratamiento con ADNasas

Se utilizó el kit *RQ1 RNase free DNase* (Promega Corporation) con el fin de eliminar la posible contaminación con ADN. Para ello se realizó la siguiente mezcla:

8 μl de agua DEPC conteniendo 1 μg de ARN

1 μl de *RQ1 RNase-Free DNase Reaction Buffer* 10X

1 μl (1U) de *RQ1 RNase-Free DNase*

Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se inactivó la enzima con 1 μ l de *RQ1 DNase Stop Solution*, a 65°C durante 10 minutos.

3.3.9. Reacción de la Transcriptasa Reversa

Para la transformación del ARN en ADNc se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Para ello se añadieron por cada 10 μl de solución conteniendo 1 μg de ARN los siguientes componentes:

2 μl de *RT Buffer* 10X

0,8 μl de *dNTP Mix* 25X (100 mM)

2 µl de Random Primers 10X

1 µl de la Transcriptasa Reversa *MultiScribe*[™] (50 U/µl)

4,2 µl de agua libre de nucleasas (Ambion®)

La mezcla de 20 μ l de volumen final se sometió a los siguientes ciclos en un termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Waltham, MA, EE.UU.):

10 minutos a 25°C 120 minutos a 37°C

5 minutos a 85°C

Con el ADNc obtenido se procedió al paso de amplificación o bien se congeló a -20° C hasta el momento de su utilización.

3.3.10. PCR cuantitativa a tiempo real

A diferencia de lo que ocurre en la PCR convencional, en la PCR a tiempo real se puede cuantificar la cantidad de producto amplificado en cada ciclo de PCR. Está basada en la detección y cuantificación de la fluorescencia emitida durante la fase exponencial.

Para el estudio de la expresión de los genes implicados en el metabolismo lipídico, LXRα, FAS, SREBP-1c y PPARγ, se llevó a cabo una de las técnicas más utilizadas para la cuantificación a tiempo real, basada en el uso de sondas hidrolizables o sondas TaqMan[®] (Applied Biosystems[®]).

Fundamento

Las sondas TagMan[®] poseen en su extremo 5' un fluoróforo denominado reporter y en el extremo 3' una molécula denominada quencher. Cuando la sonda está intacta, la proximidad entre el reporter y el quencher provoca una supresión de la fluorescencia del reporter principalmente por energía de transferencia tipo Föster (355, 356). Durante la PCR, si la secuencia diana está presente, la sonda se une específicamente entre los sitios de unión de los dos primers en la fase de anillamiento/elongación. La sonda permanece unida a dicha secuencia mientras que la polimerasa va amplificando la secuencia desde los primers hasta que llega a la sonda y la actividad nucleasa 5' del sistema ADN polimerasa escinde la sonda y la polimerización de la cadena continúa. La escisión de la sonda separa el reporter y el quencher. Esta separación resulta en un incremento de la fluorescencia del reporter. El extremo 3' de la sonda está bloqueado para prevenir la extensión de la sonda durante la PCR. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la fase exponencial de acumulación de producto. Gracias a la especificidad y la posibilidad de usar diferentes fluoróforos, esta técnica permite cuantificar la expresión de varios genes diferentes a la vez en la misma muestra (reacción multiplex).

Procedimiento

En una placa de 96 pocillos se llevó a cabo la reacción multiplex, añadiendo en cada pocillo los siguientes componentes, con un volumen final de 20 µl: 1 µl de ADNc 1 µl de la mezcla *primers*/sonda del gen problema 20X

1 µl de la mezcla primers/sonda del gen de referencia 20X

7 μl de agua libre de nucleasas

10 μl de *FastStart Universal Probe Master (Rox)* 2X (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: Etapa inicial de 10 minutos a 95°C Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C Etapa de anillamiento y elongación de 1 minuto a 60°C

Las etapas de desnaturalización, anillamiento y elongación se repitieron a lo largo de 45 ciclos. Como patrón interno para normalizar la señal entre las diferentes muestras se amplificó un fragmento específico del gen de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) marcado en VIC. Los *primers*/sondas usados para cada gen se muestran en la Tabla 1. Además, cada experimento incluyó un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no se sometieron a la transcripción reversa. Dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o producto de PCR que contaminase previamente la muestra.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems[®]). Los cambios relativos de la expresión génica se determinaron mediante cálculo del 2^{-ΔΔCt}.

Gen	Genbank	ID	Amplicón (pb)	Fluoróforo
LXRα	NM_005693.2	Hs00172885_m1	78	FAM [™]
ΡΡΑRγ	NM_015869.4	Hs01115510_m1	92	FAM TM
SREBP-1c	NM_004176.3	Hs00231674_m1	84	FAM [™]
FAS	NM_004104	Hs01005611_m1	103	FAM [™]
GAPDH	NM_002046.3	4326317E	122	VIC^TM

Tabla 1. Primers y sondas utilizados en la qPCR para el estudio de los genes lipogénicos.

Para el estudio de la replicación del VHC, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) mediante el uso de SYBR[®] Green.

Fundamento

El SYBR[®] Green es un compuesto que se une inespecíficamente a todas las moléculas de ADN de doble cadena, emitiendo entonces fluorescencia. Es necesario el uso de *primers* específicos que delimiten la región específica que se quiera amplificar. Una vez unidos, la enzima ADN polimerasa genera una cadena complementaria, formándose por lo tanto una doble cadena de ADN a la que se unirá el SYBR[®] Green, emitiéndose fluorescencia en cada ciclo. A diferencia de lo que ocurre en un ensayo TaqMan[®], no se puede llevar a cabo una reacción multiplex, por lo que la amplificación de cada gen deberá realizarse en un pocillo diferente.

Procedimiento

En una placa de 96 pocillos se añadieron los siguientes componentes por pocillo, sumando un volumen final de 20 µl:

1 μl de ADNc

1 μ l de *primer Forward* 1 μ M

1 μl de primer Reverse 1 μM

7 µl de agua libre de nucleasas

10 μ l de *FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)* 2X (Roche Diagnostics GmbH).

```
Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:
Etapa inicial de 10 minutos a 95°C
Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C
Etapa de anillamiento y elongación de 1 minuto a 60°C
```

Las etapas de desnaturalización, anillamiento y elongación se repitieron a lo largo de 45 ciclos. Como patrón interno para normalizar la señal entre las diferentes muestras se amplificó la histona H3. Los *primers* usados en cada caso se muestran en la Tabla 2 (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlín, Alemania).

La amplificación de llevó a cabo en el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems[®]). El número de copias de ARN del VHC se determinó por interpolación de los valores en una curva estándar. Ésta se generó mediante la qPCR de ADNc obtenido mediante la trancripción reversa de diluciones seriadas del genoma ARN del VHC sintetizado *in vitro*, manteniendo todas ellas una cantidad igual de ARN (1 µg), mediante la adición de ARN de Huh7.

Gen	Secuencia del Primer	
Conoma del V/HC	5'-CCTGTGAGGAACTACTGTCT-3'	
	5'-CTATCAGGCAGTACCACAAG-3'	
Histope 112	5'-AAAGCCGCTCGCAAGAGTGCG-3'	
	5'-ACTTGCCTCCTGCAAAGCAC-3'	

Tabla 2. Primers utilizados en la qPCR para el estudio de la replicación del VHC.

3.3.11. Ensayo de inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP assay)

La actividad transcripcional de LXR α y SREBP-1c se comprobó mediante un ensayo de inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina.

Fundamento

Esta técnica permite identificar la presencia de proteínas (histonas modificadas, factores de transcripción y proteínas cromosómicas no histonas) unidas directa o indirectamente al ADN. Es una técnica que ofrece una adecuada

representación fisiológica de los procesos nucleares involucrados en el procesamiento del ADN (357). Se basa en el entrecruzamiento con formaldehído y la inmunoprecipitación de los complejos cromatínicos resultantes. Se utiliza formaldehído para establecer enlaces covalentes entre las proteínas y las secuencias de ADN adyacentes. La cromatina entrecruzada es sonicada para conseguir los tamaños deseados (200-600 pb). Los fragmentos de ADN y los complejos de proteínas de interés unidos a éstos son inmunoprecipitados con anticuerpos frente a las proteínas presuntamente entrecruzadas. Los fragmentos de cromatina inmunoprecipitados pueden ser entonces examinados por PCR con *primers* específicos (358). De este modo, medimos la relación existente entre la unión de un factor de transcripción y la regulación específica de un gen concreto. Si se estudia además la presencia de la ARN polimerasa II en un exón se puede relacionar la unión del factor de transcripción con la transcripción del gen.

Reactivos

- PBS 1X pH 7,4
- PBS 1X pH 7,4 formaldehído 1%
- PBS 1X pH 7,4 glicina 125 mM
- Tampón de lisis nuclear (Tris HCl 50 mM pH 8, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM y dodecilsulfato sódico (SDS) 1%)
- Halt Protease Inhibitor Cocktail 100X (Thermo Scientific)
- Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA (Merck Millipore)
- Tampón de dilución (Tris HCl 16,7 mM pH 8, EDTA 1,2 mM, SDS 0,01%, Tritón X-100 1,1% y NaCl 165 mM)
- Tampón de baja fuerza iónica (Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, EDTA 2mM y SDS 0,1%)
- Tampón de alta fuerza iónica (Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 0,5 M, tritón 1%, EDTA 2mM y SDS 0,1%)
- Tampón de LiCl (Tris HCl 10 mM pH 8, LiCl 0,25 M, NP₄O 1%, desoxicolato 1% y EDTA 1mM)
- Tampón TE (Tris 10 mM pH 8 y EDTA 0,25 mM)
- *MB Chelex*[®] 100 Resin, Sodium Form (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.)
- Proteinasa-K (Qiagen, Hilden, Alemania)
- Tampón de carga *Blue/Orange Loading Dye* 6X (Promega Corporation)
- Tampón TAE 50X (Tris 2 M pH 8, EDTA 0,5 M y ácido acético glacial 5,7%)

Procedimiento

Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Benet *et al.*, 2010, (359) con modificaciones (Figura 9).

Las células, cultivadas en placas de 10 cm de diámetro, se lavaron dos veces con 10 ml de PBS 1X frío y se incubaron durante 10 minutos con 6 ml de formaldehído al 1% en PBS 1X en agitación suave, para permitir el entrecruzamiento entre los factores de transcripción y el ADN. Tras retirar el formaldehído al 1% en PBS 1X, se detuvo la reacción añadiendo 7,5 ml de glicina a una concentración final de 125 mM durante 5 minutos en agitación suave. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS 1X frío y se recogieron en 500 μl de tampón de lisis nuclear suplementado con inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail 1X (Thermo Scientific), despegando las células con un rascador, en hielo. Las células recogidas se pasaron 10 veces a través de una jeringa de insulina (29G) con cuidado de no formar espuma. Tras su incubación en hielo durante 15 minutos, se llevó a cabo su sonicación mediante un sonicador Digital Sonifier[®] (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EE.UU.) durante 12 pulsos de 15 segundos y 50 segundos de espera entre cada pulso (Amplitud: 20%), con el fin de obtener fragmentos de cromatina de 200-600 pb. Las muestras, una vez sonicadas, se centrifugaron a 14.000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar las veces necesarias hasta que el pellet con los residuos celulares fue inapreciable.

Tras cuantificar el ADN en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies), se separaron dos alícuotas de 200 µg de cada muestra, igualando los volúmenes de todas las muestras con tampón de lisis nuclear hasta el volumen mayor. Después se completó hasta 1 ml con tampón de dilución suplementado con inhibidores de proteasas *Halt Protease Inhibitor Cocktail* 1X (Thermo Scientific).

A continuación, se realizó un prelavado añadiendo 40 µl de *Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA* (Merck Millipore) a cada muestra e incubando durante 30 minutos en rotación a 4°C. Tras una breve centrifugación de los tubos, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Uno de los dos tubos de cada muestra se incubó con 4 µg de un anticuerpo secundario anticonejo (DAKO) como control negativo ("no anticuerpo"). El otro tubo se incubó con 4 µg del anticuerpo correspondiente frente a la proteína (factor de transcripción) de interés; en este caso, se utilizaron anticuerpos frente a LXR α , SREBP-1c (Abcam) o ARN polimerasa II (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.).

Después de una incubación con los anticuerpos durante toda la noche en rotación a 4°C, los tubos se incubaron durante 1h más tras añadir 60 µl de *Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA* (Merck Millipore) a cada muestra para permitir su unión al anticuerpo. Transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo una centrifugación de 1 minuto a 100 xg, obteniéndose 4 fracciones diferentes por cada muestra:

- Sobrenadante del tubo incubado con el anticuerpo secundario, que contiene todo el ADN de la muestra ("input").

 Pellet del tubo incubado con el anticuerpo secundario, que contiene las bolas de proteína G unidas al anticuerpo secundario y denominamos "no anticuerpo" (*"background"*).

- Sobrenadante del tubo incubado con el anticuerpo frente a la proteína de interés, que contiene el ADN al que no está unida la proteína de interés ("unbound").

 Pellet del tubo incubado con el anticuerpo frente a la proteína de interés, que contiene las bolas de proteína G unidas a los complejos anticuerpo/proteína de interés/ADN ("bound"). Los sobrenadantes fueron guardados a 4°C mientras se procedió al lavado de los pellets con 1ml de cada tampón:

-1º Tampón de baja fuerza iónica

-2º Tampón de alta fueraza iónica

-3º Tampón de LiCl

-4º Tampón TE

-5º Tampón TE

Cada lavado se realizó durante 5 minutos en rotación a 4°C, tras lo cual se realizó una centrifugación de 1 minuto a 100 xg y se desechó el sobrenadante. A continuación se añadieron 100 µl de *MB Chelex® 100 Resin, Sodium Form* (Bio-Rad) al 10% tanto a los pellets como a 50 µl de *input* y de *unbound*. Después de vortear unos segundos, todas las muestras se hirvieron durante 10 minutos y se dejaron atemperar, tras lo cual se añadió 1 µl de Proteinasa-K (Qiagen) (20 mg/ml) a cada muestra y se incubó durante 30 minutos a 55°C en agitación. A continuación las muestras se hirvieron durante 10 minutos y se dejaron atemperar. Después se centrifugaron a 100 xg y se conservó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas (Ambion®) y se volvió a centrifugar a 6.500 xg durante 1 minuto para finalmente juntar el sobrenadante con el obtenido anteriormente.

Para determinar si las diferentes fracciones (*input, bound* y "no anticuerpo") presentan el ADN correspondiente a la región del promotor de los genes estudiados (SREBP-1c y FAS) y del gen hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT), usado como control negativo, o bien para estudiar la posible unión de la ARN polimerasa II a la región codificante de los mismos, se llevó a cabo una PCR cuantitativa a tiempo real mediante el uso de SYBR® Green (protocolo descrito en el apartado 3.3.10), utilizando los *primers* descritos en la Tabla 3.

81



Figura 9. Representación esquemática del protocolo llevado a cabo para la realización del ensayo *ChIP*.

Las etapas de desnaturalización, anillamiento y elongación se repitieron durante una serie de ciclos, parándose la reacción durante la fase exponencial. De cada producto de reacción se tomaron 3 µl, que se mezclaron con 7 µl de agua libre de nucleasas (Ambion®) y 2 µl del tampón de carga (Promega Corporation) para su carga en un gel de agarosa (Invitrogen™) al 2% conteniendo un 0,005% de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Del marcador de peso molecular (Invitrogen™) se cargaron 3 µl. Entonces se llevó a cabo una electroforesis a 100 V en una cubeta con tampón TAE 1X, durante el tiempo necesario para la correcta resolución de las bandas de ADN. El bromuro de etidio actúa como agente intercalante y permite visualizar las bandas de ADN gracias a un transiluminador de luz ultravioleta Universal Hood II (Bio-Rad).

Gen	Secuencia del primer
Región del promotor	
SREBP-1c	5'-GCAGGAAGATGAGACAAATAAAGACA-3'
	5'-AATGTGGTGAGACCAACAAGCA-3'
FAS	5'-CTTGCTCCATGGGAATCCA-3'
	5'-GGGCGACAGAGCAAGACTCT-3'
HPRT	5'-ATTCGTTCAAATGCATCCTGAAAA-3'
	5'-GGTCGTAGTCGTAGTGTCAAAAGT-3'
Región codificante	
SREBP-1c	5'-CCCATTCCCCAACCTAAAGC-3'
	5'-TCCTTAAGAGTAAAAAACAGTCATTGCA-3'
FAS	5'-GAACTCCTTGGCGGAAGAGA-3'
	5'-CTCGTTGAAGAACGCATCCA-3'

Tabla 3. Primers de elección en la PCR para el ensayo ChIP.

3.3.12. Obtención del homogeneizado proteico

Las células se recogieron tras un lavado con PBS 1X y posterior tripsinización. Una vez centrifugadas, el pellet obtenido se resuspendió en tampón de sonicación, compuesto por sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM y Tris 10 mM, pH 7,4, suplementado con una mezcla de inhibidores de fosfatasas *PhosSTOP*, (Roche Diagnostics GmbH) y de proteasas *cOmplete Mini, EDTA-free*, (Roche Diagnostics GmbH), a razón de una pastilla de cada inhibidor por cada 10 ml de tampón. La sonicación se llevó a cabo con un sonicador UP50H (Hielscher, Teltow, Alemania) (Ciclo: 1, Amplitud: 60%), en hielo, mediante dos pulsos de 20 segundos.

3.3.13. Cuantificación de proteína

Una vez sonicadas las células, se procedió a la cuantificación proteica mediante el método de Bradford (360).

Fundamento

El método de Bradford se basa en la unión del pigmento de tipo trifenilmetano aniónico, Azul Brillante Coomassie, de forma no covalente, a los residuos de lisina de las proteínas. Este colorante presenta una coloración rojiza y al unirse a las proteínas adquiere una coloración azul, de una intensidad proporcional a la cantidad de proteína presente.

Procedimiento

En una placa de 96 pocillos se añadieron, por pocillo, 160 µl de cada punto de la recta patrón y en el caso de las muestras, 1 µl de homogeneizado más 159 µl de agua milliQ. A todos los pocillos de la recta patrón y de las muestras se les añadió 40 µl de Azul Brillante Coomassie (Bio-Rad) y tras una breve agitación de la placa, se dejó 10 minutos en oscuridad. Después se procedió a leer la absorbancia a 595 nm mediante un lector de placas (BioTek). Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se calculó la concentración de proteína en las muestras por interpolación de los datos en la recta patrón.

3.3.14. Western Blot

Fundamento

El estudio de la expresión génica a nivel de proteína de los genes implicados en el metabolismo lipídico, LXRα, FAS, SREBP-1c y PPARγ, así como la fosforilación de AKT o la expresión de las proteínas virales core y NS5A, se llevó a cabo mediante western blot, utilizando el protocolo de Laemmli (361).

Procedimiento

Electroforesis

La técnica de western blot comienza con una electroforesis en gel de poliacrilamida, donde las proteínas de cada muestra son separadas en función de su peso molecular. Para ello se usó un sistema Mini-PROTEAN[®] (Bio-Rad), utilizando un gel discontinuo con dos zonas diferenciadas: *Running* (en la zona inferior) y *Stacking* (en la zona superior). En la zona de *Stacking* se concentra la muestra mediante isotacoforesis, mientras que en la zona de *Running* se produce la separación de las proteínas.

Para la realización del *Running*, a una concentración del 9-12% de poliacrilamida, se preparó la siguiente mezcla:

1,8-2,4 ml de acrilamida/bis acrilamida 29:1 (Bio-Rad)

2,6-2 ml de H₂O milliQ

1,5 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

60 µl de SDS al 10% (Bio-Rad)

30 µl de persulfato amónico (APS) al 10% (Bio-Rad)

3 µl de tetrametiletilendiamida (TEMED) (Bio-Rad)

Una vez polimerizado, se realizó el *Stacking* a una concentración de poliacrilamida del 4% mediante la siguiente mezcla: 0,4 ml de acrilamida/bis acrilamida 29:1 (Bio-Rad) 2 ml de H₂O milliQ 3,3 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8

33,3 µl de SDS al 10% (Bio-Rad)

16,7 µl de APS al 10% (Bio-Rad)

3,3 μl de TEMED (Bio-Rad)

Tras añadir esta mezcla sobre el *Running*, se colocó el peine para la formación de los pocillos de carga. Una vez polimerizado el gel, se colocó dentro de la cubeta con el tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M y SDS 3,5 mM, pH 8,8). Las muestras a cargar en el gel se prepararon mezclando los microlitros de muestra correspondientes a 100 µg de proteína (según resultados de la cuantificación de proteína por el método de Bradford), con agua milliQ hasta un volumen de 75 µl y 25 µl de tampón de Laemmli 4X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 40%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,008% y β-mercaptoetanol 10%). Una vez realizada la mezcla, se calentó a 100°C durante 3 minutos. De esta mezcla, se cargaron 20 µg en cada pocillo. Del marcador de peso molecular (Thermo Scientific) se cargaron 3 µl. Una vez cargadas todas las muestras en el gel, se llevó a cabo la electroforesis a bajo voltaje (40-60 V) hasta que las muestras pasaron la zona del *Stacking* y posteriormente y hasta el final se mantuvo un voltaje de 80-120 V.

Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis, se procedió a la transferencia húmeda de las proteínas del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Bio-Rad) previamente activada mediante su introducción en metanol 15 segundos, agua milliQ 2 minutos y solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 0,2 M y metanol 20%). La membrana se mantuvo en solución de transferencia hasta su utilización. La transferencia se llevó a cabo a 100 V durante 80 minutos mediante un sistema de transferencia húmeda Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad).

Bloqueo

Una vez finalizada la transferencia, se llevó a cabo el bloqueo de los sitios inespecíficos de las proteínas mediante la introducción de la membrana en leche al 3% disuelta en PBS Tween (0,05%), 30 minutos a 37°C.

Incubación con los anticuerpos

Transcurridos los 30 minutos, se añadió disuelto en leche al 3% en PBS Tween el anticuerpo primario de conejo anti-LXRα (Abcam), anti-SREBP-1c (Abcam), anti-PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology) o anti-pAKT (Ser 473; Santa Cruz Biotechnology) o bien de ratón anti-FAS (Abcam), anti-NS5A (ViroStat) o anticore (Thermo Scientific). Este anticuerpo primario se dejó toda la noche a 4°C, y al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS Tween cada 10 minutos durante 30 minutos, tras lo cual se añadió el anticuerpo secundario correspondiente disuelto en leche al 3% en PBS Tween, anti-conejo o anti-ratón (DAKO), conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). El anticuerpo secundario se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente y al finalizar, se realizaron tres lavados con PBS Tween y uno con PBS 1X, cada 10 minutos aproximadamente. Como control de carga, en todos los casos se visualizó la expresión de la β -actina, usando un anticuerpo primario de conejo anti- β -actina (Sigma-Aldrich) y un anticuerpo secundario anti-conejo (DAKO). Como control para la fosforilación del AKT se visualizó la expresión del AKT total usando un anticuerpo primario de conejo anti-AKT (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo secundario anti-conejo (DAKO).

Revelado

Para el revelado, se introdujo la membrana durante 1 minuto en un potenciador de quimioluminiscencia *ECL* (Santa Cruz Biotechnology), se metió en una funda de plástico dentro de un *cassette* y en oscuridad se colocó una película (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido) encima de la membrana. Transcurrido un tiempo, se reveló la película introduciéndola en revelador (Fujiflim Hunt Chemicals Europa N.V., Kruibeke, Bélgica) hasta aparecer las bandas deseadas, agua, fijador (Fujiflim Hunt Chemicals Europa N.V) y por último tras un lavado con agua se dejó secar. La densidad óptica de las bandas específicas se cuantificó mediante el programa *ImageJ* (Bethesda, MD, EE.UU.).

3.3.15. Co-Inmunoprecipitación

Con el fin de detectar una posible asociación física entre las proteínas del virus y LXRα se llevó a cabo una co-inmunoprecipitación. Las células Huh7 y VHC-

G1 se lavaron con PBS 1X frío y se lisaron con un tampón compuesto de NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NP-40 1%, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM e inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific), durante 30 minutos en hielo. El volumen de lisado celular correspondiente a 1 mg de proteína se completó hasta 750 μl con el mismo tampón de lisis y se incubó con 2 μg de anticuerpo anti-LXRα (Santa Cruz Biotechnology), anti-core (Thermo Scientific), o anti-NS5A (Virostat) durante toda la noche a 4°C y en rotación. Posteriormente se añadieron 10 µl de Protein A/G PLUS Agarose (Santa Cruz Biotechnology), continuando la incubación durante una hora más a 4°C para permitir la unión de los complejos proteína-anticuerpo a las bolas de Protein A/G PLUS Agarose. Tras una centrifugación de 15 segundos a 14.000 rpm, el precipitado se lavó con 500 µl del tampón de lisis frío durante 20 minutos en rotación. Esta operación se repitió tres veces. Finalmente el pellet se resuspendió en agua milliQ hasta un volumen de 75 μl y 25 μl de tampón de Laemmli 4X y se calentó 5 minutos a 100°C, para la posterior separación de las proteínas mediante electroforesis, las cuales se analizaron mediante western blot usando los anticuerpos mencionados anteriormente.

3.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar de la media (EEM). Los datos se evaluaron mediante la prueba ANOVA combinada con el test de Newman-Keuls. Se exigió una p<0,05 para conceder significación estadística a los resultados. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 17.0 (SPSS Federal Systems, Chicago, EE.UU.).

RESULTADOS

4.1. Las proteínas NS5A y core regulan la lipogénesis mediada por LXRα contribuyendo al desarrollo de esteatosis hepática y a la replicación del VHC

4.1.1. La expresión de las proteínas core y NS5A, así como la replicación del VHC, inducen la acumulación intracelular de lípidos

El presente estudio comenzó analizando el efecto de la expresión de las proteínas NS5A y core y de la replicación del VHC sobre el acúmulo intracelular de lípidos.

En la Figura 10A aparece representada la cuantificación de lípidos totales obtenida mediante citometría de flujo en las células CHL-NS5A, CHL-core y VHC-G1. La acumulación lipídica se mostró incrementada de manera significativa en las células que expresaban las proteínas del VHC en comparación con las células control (CHL-NS5A: +245%, CHL–core: +107%). En la Figura 10B se muestran las imágenes de la tinción de lípidos con Rojo Nilo obtenidas mediante microscopía de fluorescencia, las cuales corroboran los resultados obtenidos por citometría de flujo. Asimismo, tal y como se muestra en la Figura 10C, el contenido intracelular de triglicéridos se incrementó significativamente al expresarse las proteínas del virus C (CHL–NS5A: +144%, CHL–core: +56%). Tanto en el caso del acúmulo lipídico como en el del contenido de triglicéridos el incremento fue mayor en el caso de las células que expresaban la proteína NS5A del VHC en comparación con las células que expresaban la proteína core.

Asimismo, se analizó el efecto de la replicación del virus C sobre el acúmulo intracelular de lípidos (Figuras 10A y 10B) y de triglicéridos (Figura 10C), observándose un incremento significativo tanto de la fluorescencia del Rojo Nilo debido al acúmulo de lípidos totales como del contenido de triglicéridos en las células que contenían el replicón del VHC en comparación con las células Huh7 (+190% y +169%, respectivamente).



Figura 10. Efecto de las proteínas NS5A y core y de la replicación del VHC en el acúmulo lipídico intracelular. **(A)** Histogramas representativos de la fluorescencia del Rojo Nilo obtenida mediante citometría de flujo en células CHL, CHL-NS5A y CHL-core o células Huh7 y VHC-G1. Los resultados están expresados como porcentaje de intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo respecto a las células control (100%). **(B)** Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de la tinción de lípidos totales con Rojo Nilo. Los núcleos se muestran en azul, teñidos con DAPI. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. **(C)** Representación del contenido de triglicéridos (nmol/ μ l). Los datos representados son la media ± EEM de seis experimentos (*p<0,05 *vs* CHL o Huh7, #p<0,05 *vs* CHL–core).

4.1.2. La expresión de las proteínas core y NS5A y la replicación del VHC inducen la expresión génica de LXRα y de genes lipogénicos relacionados

La expresión de las proteínas core y NS5A en las células CHL-core y CHL-NS5A, respectivamente, y en las células VHC-G1 fue confirmada mediante western blot (Figura 11C).

Respecto al efecto de dichas proteínas y de la replicación del virus C sobre la expresión de genes lipogénicos, se observó una inducción significativa de la expresión de LXR α en las células CHL-NS5A (ARNm: +190%, proteína: +66%) y CHL-core (ARNm: +40%, proteína: +31%) con respecto a las células control (Figuras 11A, 11B y 11C). Asimismo, SREBP-1c, PPAR γ y FAS resultaron significativamente sobreexpresados en las células CHL-NS5A (ARNm: +330%, +307% y +90%, respectivamente; proteína: +82%, +56% y +53%, respectivamente) y en las células CHL–core (ARNm: +60%, +205% y +50%, respectivamente; proteína: +38%, +28% y +40%, respectivamente) en comparación con las células control (Figuras 11A, 11B y 11C). El incremento de la expresión de LXR α , SREBP-1c y PPAR γ fue significativamente mayor en las células CHL-NS5A en comparación con las células CHL-core, de manera similar a lo observado con respecto al contenido de lípidos totales y triglicéridos.

Por último, tal y como cabía esperar, dichos genes se encontraron significativamente inducidos en las células que expresaban el replicón completo del VHC (ARNm, LXRα: +140%; SREBP-1c: +123%; PPARγ: +221%; FAS: +70%; proteína, LXRα: +162%; SREBP-1c: +166%; PPARγ: +118%; FAS: +64%; Figuras 11A, 11B y 11C) con respecto a sus correspondientes células control.



Figura 11. Sobreexpresión de LXR α , SREBP-1c, PPAR γ y FAS en las células CHL-NS5A, CHL-core y VHC-G1. **(A)** Cuantificación de la concentración de ARNm correspondiente a cada uno de los genes estudiados. **(B, C)** Cuantificación de la concentración de proteína correspondiente a cada uno de los genes estudiados a partir del análisis densitométrico de las bandas específicas, expresada como porcentaje relativo a las células control CHL o Huh7 (100%). La concentración de β-actina se utilizó como control de carga. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la izquierda de la imagen. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. Los datos representados son la media \pm EEM de seis experimentos (*p<0,05 vs CHL o Huh7, #p<0,05 vs CHL–core).

4.1.3. La sobreexpresión de los genes lipogénicos inducida por las proteínas NS5A y core y por la replicación del VHC está mediada por LXRα

Con el fin de determinar la contribución de la activación de LXRa a la inducción de los genes lipogénicos mediada por el VHC, se llevó a cabo el ensayo ChIP. Así, se comprobó la unión de LXRa a la secuencia LXRE en el promotor de los genes SREBP-1c y FAS en las células CHL-NS5A y CHL-core, siendo casi indetectable en las células CHL (Figura 12A). De la misma manera, en células VHC-G1 también fue evidente la unión de LXR α a su elemento de respuesta en el promotor de SREBP-1c y FAS (Figura 12B). Para examinar la contribución de la activación de SREBP-1c a la inducción lipogénica mediada por LXR α , se llevó a cabo también un ensayo ChIP para el análisis de la unión de SREBP-1c a la secuencia SRE en el promotor de SREBP-1c y FAS. Tal y como se muestra en la Figura 12C, SRE resultó activado en los promotores de SREBP-1c y FAS de CHL-NS5A y CHL-core. La señal fue muy débil en el caso de las células control. Asimismo, SRE fue claramente activado en los promotores de SREBP-1c y FAS en las células VHC-G1, sugiriendo su implicación en la modulación de la expresión de ambos genes (Figura 12D). Estos resultados indican que core y NS5A, así como la replicación del VHC, también indujeron la actividad transcripcional de SREBP-1c, al menos en parte de una manera dependiente de LXR α , contribuyendo al incremento de la lipogénesis asociada al VHC.

Por otra parte, no se observó unión al promotor de HPRT (usado como control negativo), indicando la unión específica de LXRα y SREBP-1c a la secuencia de sus respectivos elementos de respuesta en los promotores de SREBP-1c y FAS (Figuras 12A, 12B, 12C y 12D). Cuando se inmunoprecipitó la enzima ARN polimerasa II, se observó una señal débil correspondiente a la expresión de SREBP-1c y FAS en las células CHL y Huh7; sin embargo, la ARN polimerasa II se unió en mayor medida a la región codificante de SREBP-1c y FAS en las células CHL y GREBP-1c y FAS en las células CHL-NS5A, CHL-core y VHC-G1 tal y como muestra la presencia de una mayor señal, proporcionando un excelente control de la transcripción a tiempo real (Figuras 12E y 12F).

95



Figura 12. Las proteínas core y NS5A y la replicación del VHC potencian la unión de LXRα y de SREBP-1c a su elemento de respuesta correspondiente en los promotores de SREBP-1c y FAS. **(A, B)** Inmunoprecipitación de complejos LXRα-cromatina y amplificación de la región promotora de SREBP-1c, FAS y HPRT. **(C, D)** Inmunoprecipitación de complejos SREBP-1c-cromatina y amplificación de la región promotora de SREBP-1c, FAS y HPRT. **(E, F)** Inmunoprecipitación de los complejos ARN polimerasa II-cromatina y amplificación de la región codificante de SREBP-1c y FAS. La cromatina total (Input) y las muestras no incubadas con los anticuerpos específicos (no anticuerpo) fueron incluidas en las reacciones de PCR. Los productos de PCR obtenidos con *primers* específicos para la región promotora de HPRT fueron incluidos como controles negativos. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

4.1.4. LXRα y las proteínas core y NS5A no colocalizan en las células VHC-G1

Con el fin de establecer los mecanismos moleculares implicados en el efecto de las proteínas NS5A y core y la replicación del VHC sobre la expresión de LXR α y de los principales genes lipogénicos se estudió una posible interacción directa entre dichas proteínas del virus C y el receptor nuclear LXR α .

En primer lugar, se comprobó mediante microscopía de fluorescencia que las proteínas core y NS5A tenían una localización citoplasmática, concentrándose dichas proteínas fundamentalmente alrededor del núcleo celular, mientras que LXRα se localizó principalmente en el núcleo (Figura 13A). A pesar de la

existencia de una pequeña cantidad de LXRα en el citoplasma, no se observó una asociación entre dicho receptor nuclear y las proteínas del VHC.

Posteriormente, para confirmar estos resultados se llevó a cabo una inmunoprecipitación de LXRα, core y NS5A y se descartó mediante western blot una posible co-inmunoprecipitación de core o NS5A al inmunoprecipitar LXRα o de LXRα al inmunoprecipitar NS5A o core (Figura 13B).



Figura 13. Ausencia de asociación física entre LXRα y las proteínas core y NS5A en las células VHC-G1. **(A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia donde se muestra LXRα (verde), las proteínas del VHC (rojo) y los núcleos celulares (azul). La superposición de las imágenes mostrando LXRα y core o LXRα y NS5A se muestran a la derecha (Merged). Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. **(B)** Inmunoprecipitación de LXRα y las proteínas del VHC. Los lisados de las células Huh7 y VHC-G1 se sometieron a inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos para LXRα, NS5A o core. Tanto los inmunoprecipitados como los lisados se analizaron mediante western blot con los anticuerpos indicados.

4.1.5. La inhibición de la vía PI3K/AKT atenúa la sobreexpresión de LXRα mediada por la expresión de las proteínas core y NS5A y por la replicación del VHC

Dada la ausencia de una interacción directa entre el receptor nuclear LXR α y las proteínas NS5A y core del VHC, se estudió la posible implicación de la vía de señalización PI3K/AKT como mecanismo molecular a través del cual el VHC podría inducir la expresión de LXR α y de los principales genes lipogénicos.

Por ello, se investigó el efecto de la inhibición química de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) con LY294002 sobre la inducción de la expresión de LXRα asociada a la expresión de las proteínas del VHC y a la replicación viral. La activación de AKT fue evaluada mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-pAKT y anti-AKT.

Se observó una inducción significativa de la fosforilación de AKT en las células CHL-NS5A (+132%), CHL-core (+52%) y VHC-G1 (+140) en comparación con sus respectivas células control (Figuras 14A y 14B). Las células tratadas con LY294002 mostraron una actividad AKT reducida comparada con las células no tratadas (CHL–NS5A: -91%, CHL–core: -72% y VHC-G1: -79%), indicando que la fosforilación de AKT inducida por las proteínas del VHC y por la replicación viral se encontraba regulada por PI3K (Figuras 14A y 14B). Además, la inhibición de la actividad AKT se acompañó de una reducción de la sobreexpresión de LXR α mediada por las proteínas NS5A y core y por la replicación viral (ARNm, CHL–NS5A: -45%; CHL–core: -58%; VHC-G1: -46%; proteína, CHL–NS5A: -81%; CHL–core: -68%; VHC-G1: -84%; Figuras 14A, 14B y 14C).

Estos resultados sugieren la implicación la actividad de la vía PI3K/AKT en la modulación de la expresión de LXRα mediada por las proteínas NS5A y core del VHC y por la replicación del virus de la hepatitis C.



Figura 14. Efecto de la inhibición de la vía PI3K/AKT sobre la sobreexpresión de LXR α mediada por las proteínas core y NS5A del VHC y por la replicación viral. **(A, B)** Cuantificación de la concentración de proteína correspondiente a LXR α y del porcentaje de fosforilación de AKT a partir del análisis densitométrico de las bandas específicas, expresada como porcentaje relativo a las células control CHL o Huh7 (100%). La concentración de β -actina se utilizó como control de carga. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. **(C)** Cuantificación de la concentración de ARNm correspondiente a LXR α . Los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos (*p<0,05 vs CHL o Huh7, #p<0,05 vs células no tratadas).

4.1.6. La modulación de la expresión de LXRα regula la expresión de los genes lipogénicos y la replicación del VHC en las células VHC-G1

Con el fin de confirmar que la lipogénesis inducida por el VHC está asociada con la vía dependiente de LXRα, se examinó el efecto del silenciamiento de LXRα, así como el tratamiento con un agonista del mismo, GW3965, sobre la acumulación lipídica y la expresión de los genes lipogénicos en células VHC-G1.

La transfección con el control negativo *siRNA* no afectó ni a la expresión de LXRα ni a la replicación del virus o a la expresión de sus proteínas, constituyendo un control adecuado en este estudio. Tal y como se muestra en la Figura 15A, el silenciamiento de LXRα mediante el *siRNA* específico para éste, indujo una disminución de la concentración del ARNm de LXRα (-92%), así como de los demás genes lipogénicos estudiados (SREBP-1c: -74%, PPARγ: -72% y FAS: -77%) en comparación con las células VHC-G1 transfectadas con el *siRNA* control negativo. De la misma manera, la acumulación intracitoplasmática de lípidos se redujo significativamente en las células VHC-G1 con el LXRα silenciado (-60% *vs* células VHC-G1 transfectadas con el *siRNA* control negativo). La inhibición de la lipogénesis mediada por el silenciamiento de LXRα se acompañó de una reducción significativa del número de copias del ARN del virus C (-35%) así como de la concentración de proteína NS5A y core (Figuras 15B y 15C).

Por otra parte, el tratamiento con el agonista de LXR α provocó un aumento de la concentración de ARNm de LXR α , SREBP-1c, PPAR γ y FAS (+361%, +337%, +273% y +154%, respectivamente) en comparación con las células VHC-G1 transfectadas con el *siRNA* control negativo (Figura 15A). Además, este incremento se acompañó de un aumento de la acumulación de lípidos en las células tratadas con el agonista (+143% *vs* células VHC-G1 transfectadas con el *siRNA* control negativo), así como de la replicación del virus (+160%) y de la expresión de sus proteínas NS5A y core (Figuras 15B y 15C). Para examinar si el efecto del agonista sobre el incremento de la replicación del VHC era realmente debido a la activación de LXR α , se trataron con el agonista las células VHC-G1 teniendo el LXRα silenciado, no viéndose afectada la replicación viral ni la expresión de las proteínas del VHC (Figuras 15B y 15C). En conjunto, dichos resultados sugieren un papel clave del receptor nuclear LXRα en la regulación de la replicación del VHC.



Figura 15. Efecto del silenciamiento de LXR α y del tratamiento con un agonista del mismo sobre la expresión de los genes lipogénicos, la replicación del VHC y la expresión de sus proteínas en células VHC-G1. **(A)** Cuantificación de la concentración de ARNm correspondiente a LXR α , SREBP-1c, PPAR γ y FAS (*p<0,05 *vs* células Huh7 transfectadas con el *siRNA* control negativo, #p<0,05 *vs* células VHC-G1 transfectadas con el *siRNA* control negativo). **(B)** Cuantificación de la replicación del VHC expresada como número de copias de ARN del VHC por µg de ARN total. Las células fueron tratadas con IFN α -2b (50U/ml) como control de la inhibición de la replicación. Los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos (*p<0,05 *vs* células VHC-G1 transfectadas con el *siRNA* control negativo). **(C)** La concentración de las proteínas NS5A y core se analizó mediante western blot. La concentración de β -actina se usó como control de carga. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la izquierda de la imagen. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes.

4.2. La quercetina modula la lipogénesis dependiente de PI3K-LXRα mediada por estrés oxidativo/nitrosativo, contribuyendo a la inhibición de la replicación del VHC

4.2.1. La quercetina es el flavonoide más efectivo en la inhibición de la replicación del VHC

Con el fin de examinar el efecto del tratamiento con diferentes flavonoides sobre la eficiencia de replicación del VHC, se cultivaron células VHC-G1 con quercetina, kaempferol, taxifolina y apigenina (Figura 16) a concentraciones de 0,1, 1 y 5 μ M o con el correspondiente vehículo, como control del tratamiento. A tan bajas concentraciones los flavonoides no muestran toxicidad y su limitada capacidad anti-peroxidativa no interfiere con su actividad anti-VHC (104).

Como se muestra en la Figura 17, todos los flavonoides fueron capaces de reducir de manera significativa el número de copias de ARN del VHC (K0,1: -35%, K1: -43%; T0,1: -32%, T1: -39%, T5: -43%; A0,1: -40%, A1: -30%, *vs* células tratadas con el vehículo), si bien la quercetina pareció ser el inhibidor más efectivo de la replicación del VHC a dosis similares a las concentraciones plasmáticas observadas en humanos tras la administración de quercetina (348).







Figura 17. Efecto de los diferentes flavonoides sobre la replicación del VHC en células VHC-G1. Cuantificación de la replicación expresada como copias de ARN del VHC por μ g de ARN total. Los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 *vs* células VHC-G1 no tratadas).

En vista de los resultados anteriores, las células VHC-G1 se incubaron con quercetina a concentraciones de 0,1, 0,5, 1 y 5 μ M, sola o en combinación con IFN α 0,5. Asimismo, las células VHC-G1 se trataron con IFN α 50 como control de la inhibición de la replicación (-90% *vs* células no tratadas).

Como se esperaba, la quercetina causó un descenso de la replicación del VHC dependiente de la dosis a todas las concentraciones probadas (Q0,1: -49%, Q0,5: -52%, Q1: -57%, Q5: -61%, *vs* VHC-G1 no tratadas). Cuando la quercetina se combinó con IFNα 0,5 se observó un marcado efecto antiviral (Q0,1: -55%, Q0,5: -62%, Q1: -68%, Q5: -72%, *vs* VHC-G1 no tratadas), superando al derivado del tratamiento único con IFNα 0,5 (Q0,5: -24%, Q1: -34%, Q5: -43%, *vs* células VHC-G1 IFN 0,5) (Figura 18).

De forma similar, la quercetina fue capaz de reducir de manera dependiente de la dosis la concentración de las proteínas core y NS5A en las células VHC-G1 (NS5A, Q0,1: -24%, Q0,5: -27%, Q1: -54%, Q5: -67%; core, Q0,5: -32%, Q1: -50%, Q5: -62%, vs VHC-G1 no tratadas), mostrando un marcado efecto inhibidor en combinación con IFN α 0,5 (NS5A, Q0,1: -62%, Q0,5: -67%, Q1: -71%, Q5: -78%; core, Q0,1: -51%, Q0,5: -53%, Q1: -63%, Q5: -70%, vs VHC-G1 no tratadas). Además, el tratamiento combinado superó la capacidad de inhibición mostrada por el IFN α 0,5 (NS5A, Q0,5: -21%, Q1: -32%, Q5: -48%; core, Q0,1: -16%, Q0,5: -19%, Q1: -37%, Q5: -49%, vs células VHC-G1 IFN 0,5) (Figura 19).

Tal y como se muestra en la Figura 20, dicha actividad antiviral no se asoció a citotoxicidad o alteración de la proliferación celular.



Figura 18. Efecto del tratamiento con quercetina y su combinación con IFN α sobre la replicación viral en células VHC-G1. Cuantificación de la replicación expresada como número de copias de ARN del VHC por µg de ARN total. Los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes (***p<0,001 vs células VHC-G1 no tratadas, ##p<0,01 vs VHC-G1 IFN α 0,5).







Figura 20. Efecto del tratamiento con quercetina y su combinación con IFN α sobre la viabilidad celular en células VHC-G1. Viabilidad celular determinada mediante ensayo MTT. Los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes.

4.2.2. La quercetina inhibe el estrés oxidativo y nitrosativo en las células VHC-G1

Para determinar la contribución de la capacidad antioxidante de la quercetina en la inhibición de la replicación del virus de la hepatitis C, se investigó la generación de EROs/ERNs y la peroxidación lipídica en células VHC-G1 mediante citometría de flujo. Las células fueron incubadas con quercetina $(0,1-5 \mu M)$, IFN α o con el vehículo (DMSO) durante 48h.

Tal y como se muestra en las Figuras 21 y 22, la replicación del virus indujo estrés oxidativo y nitrosativo, tal y como indicó el incremento significativo de la generación de EROs/ERNs (DCF: +55%, ETH: +56%), así como peroxidación lipídica (+350%), en comparación con las células Huh7.

El análisis de los histogramas en los que la fluorescencia fue representada frente al número relativo de células, así como la cuantificación de la correspondiente intensidad de fluorescencia, indicó que la quercetina es capaz de disminuir la sobreproducción de EROs/ERNs inducida por el VHC (DCF: Q0,5: - 13%, Q1: -22%, Q5: -28%; ETH: Q0,1: -29%, Q0,5: -32%, Q1: -34%, Q5: -35%, vs

células VHC-G1 no tratadas) (Figuras 21 y 22A), reduciendo asimismo parcialmente la peroxidación lipídica incrementada en las células VHC-G1 (Q0,5: - 25%, Q1: -27%, Q5: -30%) (Figura 22B).

De manera similar, el IFNα 50 provocó un descenso significativo de la generación de EROs/ERNs (DCF: -30%; ETH: -22%) y de la lipoperoxidación (-17%) en las células VHC-G1 (Figuras 21 y 22).

Estos resultados sugieren que la quercetina modula la generación de estrés oxidativo y nitrosativo pudiendo jugar dicho efecto un papel importante en su actividad antiviral.



Figura 21. Efecto del tratamiento con quercetina o IFN α sobre la producción de EROs y ERNs en células VHC-G1. Histogramas representativos de la fluorescencia del DCF obtenida mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como porcentaje de intensidad de fluorescencia del DCF respecto a las células VHC-G1 no tratadas (100%). Todos los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01; vs células Huh7, ##p<0,01 vs VHC-G1 no tratadas).



Figuras 22. Efecto del tratamiento con quercetina o IFN α sobre la producción de anión superóxido y sobre la peroxidación lipídica en células VHC-G1. **(A)** Histogramas representativos de la fluorescencia del ETH obtenida mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como porcentaje de intensidad de fluorescencia del ETH respecto a las células VHC-G1 no tratadas (100%). **(B)** Cuantificación de la fluorescencia del Bodipy 581/591 C₁₁ obtenida mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como porcentaje de intensidad de fluorescencia del Bodipy 581/591 C₁₁ obtenida mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como porcentaje de intensidad de fluorescencia del Bodipy 581/591 C₁₁ respecto a las células VHC-G1 no tratadas (100%). Todos los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs células Huh7, #p<0,05; ##p<0,01 vs VHC-G1 no tratadas).

4.2.3. La quercetina disminuye la acumulación intracitoplasmática de lípidos inducida por el VHC

La contribución de la modulación del metabolismo lipídico a la inhibición de la replicación del VHC por la quercetina se estableció mediante el estudio del efecto de este flavonol en la acumulación intracitoplasmática de lípidos en células VHC-G1.

Los resultados del análisis por citometría de flujo de las células sometidas a la tinción con Bodipy 493/503 están representados en la Figura 23C. Tal y como se muestra, la acumulación de lípidos se incrementó notablemente en las células que expresaban el replicón completo del VHC (+257%) en comparación con las células Huh7 y el tratamiento con quercetina causó un descenso significativo, dependiente de la dosis, del acúmulo lipídico en las células VHC-G1 (Q0,5: -17%, Q1: -22%, Q5: -55%, vs células VHC-G1 no tratadas).

Las imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de la tinción de lípidos con Bodipy 493/503 corroborando los resultados obtenidos mediante citometría de flujo se muestran en la Figura 23A.

Posteriormente, se analizó la acumulación intracelular de triglicéridos (TG) y ácidos grasos libres (AGL) y, tal y como se esperaba, las concentraciones fueron significativamente superiores en células VHC-G1 (+150% y +81%, respectivamente) en comparación con las células Huh7 (Figura 23B), resultando reducidas gracias al tratamiento con quercetina (TG, Q0,5: -31%, Q1: -40%, Q5: -49%; AGL, Q0,5: -23%, Q1: -24%, Q5: -26%, vs VHC-G1 no tratadas).

Por último, el IFN α 50 fue capaz de disminuir también la acumulación intracelular de lípidos inducida por el virus (-20%) mediante la reducción del contenido de triglicéridos y ácidos grasos libres (-44% y -36%, respectivamente) (Figuras 23A, 23B y 23C).





Figura 23. Efecto del tratamiento con quercetina o IFN α sobre la acumulación intracitoplasmática de lípidos en células VHC-G1. **(A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de la tinción de lípidos con Bodipy 493/503 (verde). Los núcleos celulares se muestran en azul, teñidos con DAPI. Las imágenes son representativas de seis experimentos. **(B)** Representación del contenido de triglicéridos y ácidos grasos libres (µg/mg de proteína). **(C)** Histogramas representativos de la fluorescencia del Bodipy 493/503 obtenida mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como porcentaje de intensidad de fluorescencia del Bodipy 493/503 respecto a las células VHC-G1 no tratadas (100%).Los datos representados corresponden a la media \pm EEM de seis experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 *vs* células Huh7, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 *vs* VHC-G1 no tratadas).

4.2.4. La quercetina disminuye la sobreexpresión de los génes lipogénicos asociada a la replicación del VHC

Una vez comprobada la capacidad de la quercetina para reducir la acumulación intracitoplasmática de lípidos inducida por el VHC, se investigó el papel de la vía dependiente de LXRα en dicho efecto de la quercetina.

Como se muestra en la Figura 25, se observó una inducción significativa de la expresión génica de LXR α en las células VHC-G1 (ARNm, +82%; proteína, +55%) en comparación con las células Huh7. Con respecto a la expresión de los genes lipogénicos relacionados con LXR α , tal y como se esperaba, se encontró también una inducción significativa de la concentración de ARNm de FAS en las células que expresaban el replicón completo del VHC (+94%, *vs* Huh7) (Figura 24).



Figura 24. Efecto del tratamiento con quercetina o IFN α sobre la expresión de FAS en células VHC-G1. Cuantificación de la concentración de ARNm correspondiente a FAS. Los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes (**p<0,01; ***p<0,001 *vs* células Huh7, ##p<0,01; ###p<0,001 *vs* VHC-G1 no tratadas).

Una vez más, la quercetina fue capaz de reducir la sobreexpresión de LXRα inducida por el virus a todas las concentraciones probadas (ARNm, Q0,1: -32%, Q0,5: -38%, Q1: -39%, Q5: -40%; proteína, Q0,1: -16%, Q0,5: -19%, Q1: -35%, Q5: -34% *vs* células VHC-G1 no tratadas) (Figuras 25A y 25B). De manera similar, el tratamiento con quercetina provocó una reducción de la concentración de ARNm de FAS (Q0,1: -16%, Q0,5: -14%, Q1: -17%, Q5: -20% *vs* células VHC-G1 no

tratadas) (Figura 24). Un hallazgo interesante fue que el IFNα también redujo la inducción de LXRα (IFNα 0,5: ARNm, -25%, proteína, -31%; IFNα 50: ARNm, -45%, proteína, -58%; Figuras 25A y 25B) y la subsecuente sobreexpresión de FAS (IFNα 0.5: -30%; IFNα 50: -68%; Figura 24) en las células VHC-G1.



Figura 25. Efecto del tratamiento con quercetina o IFN α sobre la expresión de LXR α en células VHC-G1. **(A)** Cuantificación de la concentración de proteína correspondiente a LXR α a partir del análisis densitométrico de las bandas específicas, expresada como porcentaje relativo a las células VHC-G1 no tratadas (100%). La concentración de β -actina se usó como control de carga. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la derecha de la imagen. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. **(B)** Cuantificación de la concentración de ARNm correspondiente a LXR α . Los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs células Huh7, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,01; ###p<0,001 vs VHC-G1 no tratadas).

4.2.5. La quercetina reduce la sobre expresión de LXR α inducida mediante infección adenoviral

Con el fin de corroborar el efecto de la quecetina sobre la expresión génica de LXRα, se infectaron células Huh7 con un vector adenoviral que codifica para dicho receptor nuclear.

En primer lugar se examinó el efecto de la infección adenoviral sobre la expresión de LXRα. Tal y como muestra la Figura 26 se confirmó la sobreexpresión de LXRα en células infectadas con el vector adenoviral mediante RT-qPCR, inmunofluorescencia y western blot (proteína, Huh7 Ad-0,5: +257%, *vs* Huh7 Ad-CONT).

Posteriormente, se analizó el efecto de la quercetina sobre la acumulación intracitoplasmática de lípidos y la concentración de ARNm de LXRα en células Huh7 Ad-0,5 (Figuras 27A y 27B, respectivamente). Se observó que la quercetina redujo el acúmulo lipídico intracelular a todas las concentraciones probadas, como muestran las imagenes de fluorescencia de la tinción de lípidos con Bodipy 493/503 en los distintos grupos de estudio (Figura 27A). Asimismo, la quercetina causó una reducción dependiente de la dosis de la sobreexpresión de LXRα derivada de la infección adenoviral (Q0,1: -27%, Q0,5: -39%, Q1: -46%, Q5: -58%, *vs* células Huh7 Ad-0,5 no tratadas), mientras que la sobreexpresión del receptor nuclear no se vio afectada por el IFNα (Figura 27B).

En conjunto, todos estos resultados indican que la quercetina ejerce un efecto inhibidor sobre la expresión de LXRa y la acumulación de lípidos tanto en el modelo de sobreexpresión de LXRa como en las células VHC-G1, sugiriendo que la inhibición de LXRa por la quercetina contribuye a la modulación de la lipogénesis inducida por el VHC.


Figura 26. Inducción de la sobreexpresión de LXR α mediante infección adenoviral. Las células Huh7 se infectaron con 0,5 o 1 µl del vector adenoviral que codifica para LXR α (Huh7 Ad-0,5 y Huh7 Ad-1, respectivamente) o con el vector adenoviral vacío (Huh7 Ad-CONT). **(A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando LXR α (verde) y los núcleos celulares (azul). Las imágenes son representativas de seis experimentos. **(B)** Cuantificación de la concentración de ARNm correspondiente a LXR α (panel inferior), y de su proteína (panel superior) a partir del análisis densitométrico de las bandas específicas expresada como porcentaje relativo a las células Huh7 Ad-CONT (100%). La concentración de β -actina se usó como control de carga. Los pesos moleculares (kDa) se indican a la derecha de la imagen. Las imágenes son representativas de seis experimentos (***p<0,001 vs Huh7 Ad-CONT).



В





Figura 27. Efecto del tratamiento con quercetina o IFN α sobre la sobreexpresión de LXR α y sobre la acumulación intracitoplasmática de lípidos en células Huh7 Ad-0,5. **(A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de la tinción de lípidos con Bodipy 493/503 (verde). Los núcleos celulares se muestran en azul, teñidos con DAPI. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. **(B)** Cuantificación de la concentración de ARNm correspondiente a LXR α . Los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes (***p<0,001 vs células Huh7 Ad-CONT, #p<0,05; ##p<0,01 vs Huh7 Ad-0,5 no tratadas).

4.2.6. La vía PI3K/AKT está implicada en el efecto inhibidor de la quercetina sobre la lipogénesis mediada por LXRα en células VHC-G1

El siguiente paso llevado a cabo en el estudio, consistió en establecer el papel de la vía PI3K/AKT en el efecto de la quercetina sobre la modulación de la lipogénesis dependiente de LXRα, para lo cual se comenzó determinando el efecto de la quercetina sobre la activación de AKT.

Como se muestra en la Figura 28A, y tal y como ya se había comprobado con anterioridad, la replicación del VHC indujo un incremento significativo de la fosforilación de AKT (+117%) en comparación con las células Huh7.

Se observó asimismo que el tratamiento con quercetina es capaz de causar una reducción dependiente de la dosis de la activación de AKT (Q0,1:-27%, Q0,5: -30%, Q1: -35%, Q5: -43%, *vs* células VHC-G1 no tratadas). Sin embargo, el tratamiento con IFN α 50 provocó un ligero aumento en la fosforilación de AKT (+21%) en comparación con las células VHC-G1 no tratadas (Figura 28A).

Para corroborar que la quercetina inhibe la lipogénesis mediada por el VHC a través de la vía PI3K/AKT, se estudió posteriormente el efecto del inhibidor de la PI3K, LY294002, sólo o combinado con quercetina, sobre la expresión génica de LXRα, la acumulación lipídica y la eficiencia de replicación del VHC.

Primero se confirmó que la viabilidad celular no se vio afectada por los diferentes tratamientos (Figura 28F). Como se muestra en las Figuras 28B, 28C, 28D y 28E, el tratamiento con LY294002 causó una reducción significativa de la replicación del VHC, de la concentración de ARNm de LXRα y de la acumulación lipídica (-31%, -48% y -66%, respectivamente, *vs* células VHC-G1 no tratadas).

Además el efecto antiviral fue mayor cuando se combinaron el inhibidor de PI3K y la quercetina (LY Q0,1: -53%, LY Q0,5: -47%, LY Q1: -52%, LY Q5: -49%, vs células VHC-G1 no tratadas) (Figura 28B). Dicha actividad antiviral conjunta se asoció a una gran reducción de la expresión génica de LXRα (LY Q0,1: -55%, LY

Q0,5: -59%, LY Q1: -66%, LY Q5: -66%, vs células VHC-G1 no tratadas) (Figura 28C) y de la acumulación lipídica en células VHC-G1 (LY Q0,1: -69%, LY Q0,5: -67%, LY Q1: -82%, LY Q5: -84%) (Figuras 28D y 28E).

En conjunto, estos resultados sugieren que la inactivación de la vía PI3K mediada por la quercetina puede contribuir al efecto de este flavonol sobre la modulación de la lipogénesis dependiente de LXR α y la replicación viral.



Figura 28. Efecto del tratamiento con quercetina o IFNa y LY294002 sobre la lipogénesis dependiente de LXRa mediada por la vía PI3K/AKT en células VHC-G1. (A) Cuantificación del porcentaje de fosforilación de AKT a partir del análisis densitométrico de las bandas específicas, expresada como porcentaje relativo a las células VHC-G1 no tratadas (100%). Los pesos moleculares (kDa) se indican a la derecha de la imagen. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. (B) Cuantificación de la replicación del VHC expresada como número de copias de ARN del VHC por µg de ARN total. (C) Cuantificación de la concentración de ARNm correspondiente a LXRa. (D) Fluorescencia del Bodipy 493/503 obtenida mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como porcentaje de intensidad de fluorescencia del Bodipy 493/503 respecto a las células VHC-G1 no tratadas (100%). (E) Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de la tinción de lípidos con Bodipy 493/503 (verde). Los núcleos celulares se muestran en azul, teñidos con DAPI. Las imágenes son representativas de seis experimentos independientes. (F) Viabilidad celular determinada mediante ensayo MTT. Todos los datos representados corresponden a la media ± EEM de seis experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs células Huh7, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 vs VHC-G1 no tratadas, ++p<0,01; +++p<0,001 vs VHC-G1 LY).



y 493/503	



120





DISCUSIÓN

A pesar de que la infección del VHC está frecuentemente asociada al desarrollo de esteatosis hepática, los mecanismos moleculares involucrados en dicho proceso no se conocen con exactitud (362-364).

A modo de resumen, en el presente trabajo se muestra en primer lugar la implicación de la vía de regulación de LXRα en la lipogénesis inducida por el virus de la hepatitis C. El hallazgo más interesante de este estudio fue comprobar la inducción por parte del VHC de la acumulación lipídica intracelular y de la sobreexpresión de los principales genes lipogénicos, proceso mediado por la activación del receptor nuclear LXRα, lo cual avala los resultados obtenidos previamente en pacientes con VHC (365). Además, se demostró que ambas proteínas del virus, NS5A y core, contribuyen a la lipogénesis mediada por LXRα a través de una inducción indirecta de éste mediante la activación de la vía de señalización PI3K/AKT. Finalmente se demostró que la modulación de la capacidad de replicación del mismo.

Diversos estudios indican que el factor de trascripción LXRα induce la expresión de los genes lipogénicos involucrados en la síntesis de ácidos grasos (366, 367). En el presente estudio se observó que las proteínas NS5A y core estimulan la acumulación intracelular de lípidos totales y triglicéridos mediante la inducción de la expresión y de la actividad transcripcional de LXRα, lo cual conduce a un incremento de la expresión de los genes lipogénicos SREBP-1c, PPARγ y FAS, regulados por dicho receptor nuclear. Un hallazgo interesante consistió en el establecimiento de una mayor capacidad lipogénica derivada de la expresión de la poteína NS5A que de la proteína core. El receptor nuclear LXRα forma heterodímeros con RXRα y activa la transcripción de SREBP-1c, PPARγ y FAS mediante su unión a la secuencia LXRE presente en sus promotores (367-369). A su vez, SREBP-1c activa genes involucrados en el metabolismo de lípidos y del colesterol, como FAS, mediante su unión a la secuencia SRE presente en sus promotores (369, 370). En nuestro estudio, el efecto inductor de la lipogénesis

mediado por las proteínas NS5A y core y la propia replicación del VHC se derivó de la sobreexpresión y activación transcripcional de LXR α , actuando sobre las regiones LXRE de los promotores de los genes lipogénicos. Asimismo, se observó que la activación del elemento de respuesta a esteroles en los genes involucrados en la lipogénesis *de novo*, incluyendo la activación de SREBP-1c por la unión del mismo a la secuencia SRE de su propio promotor, contribuye al efecto lipogénico derivado de la expresión de las proteínas del virus C. Tanto la activación transcripcional de LXR α como de SREBP-1c contribuirían a la sobreexpresión de FAS observada en nuestros modelos *in vitro* de hepatitis C.

Se ha descrito que la proteína core del VHC puede inducir la activación transcripcional del promotor de SREBP-1c mediante el incremento de la unión de LXRa/RXRa a la secuencia LXRE en un modelo in vivo, si bien la proteína core no se halla incluida en el complejo LXR α /RXR α -LXRE, sugiriendo la implicación de core en una activación indirecta del promotor de SREBP-1c (371). Además, se ha demostrado que la proteína NS5A aumenta la acumulación hepática de lípidos mediante la inducción de la activación de PPAR γ y SREBP-1c (9, 10). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la inducción de dichos genes lipogénicos en presencia de las proteínas del virus C parece estar mediada por la sobreexpresión y activación transcripcional del receptor nuclear LXR α , si bien es necesario establecer los mecanismos involucrados en dicha activación. A este respecto, distintas investigaciones llevadas a cabo muestran que la proteína X del virus de la hepatitis B induce la expresión de genes lipogénicos mediante la activación de LXR α (372). De hecho, la proteína X del virus de la hepatitis B interactúa físicamente con LXR α en el núcleo y potencia la unión de LXR a la secuencia LXRE (373).

En el presente estudio, las proteínas core y NS5A se localizaron en el citoplasma de las células que incluían el genoma completo del VHC, tal y como había sido previamente descrito (374, 375). Por su parte, en nuestro estudio la localización de LXRα fue fundamentalmente nuclear, donde la presencia de las

proteínas del virus C era mínima. Además, los experimentos de coinmunoprecipitación indicaron que no existe una interacción física entre LXRα y las proteínas del VHC. Dichos resultados parecen indicar que la modulación de la lipogénesis dependiente de LXRα por las proteínas NS5A y core se lleva a cabo mediante un mecanismo indirecto.

A este respecto, en el presente estudio las proteínas NS5A y core del VHC indujeron la activación de AKT, una importante kinasa fosforilada por PI3K. Estos resultados concuerdan con previas investigaciones que demuestran que las proteínas del virus C activan la vía de señalización PI3K/AKT (93, 376, 377). Así, se ha sugerido que la expresión génica del VHC induce la activación de la vía PI3K/AKT mediante mecanismos que involucran al estrés oxidativo y la vía de señalización de calcio (11). Se ha descrito previamente que las proteínas NS5A y core inducen alteraciones en la homeostasis de calcio mediadas por la aparición de estrés oxidativo en células CHL, lo cual podría explicar los efectos que ambas proteínas tienen sobre la vía PI3K/AKT (97). Asimismo, se ha indicado que la inducción de la expresión de SREBP-1c por la proteína core del VHC requiere de la activación de la vía PI3K/AKT (376), proceso que se llevaría a cabo junto con la proteína NS4B (11, 119). Así, se ha descrito que AKT puede incrementar el transporte de SREBP desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, la concentración de SREBP maduro y la fosforilación de SREBP, aunque no se han visto efectos sobre la transcripción del mismo (11, 376).

Además, se ha descrito que la administración de inhibidores de la vía PI3K es capaz de reducir la sobreexpresión de LXR derivada de la inducción con agonistas en macrófagos (378). En el presente estudio, la inhibición de la vía PI3K mediante LY294002 atenuó la sobreexpresión de LXRα inducida por las proteínas core y NS5A del virus C. Estos resultados indican por primera vez el papel de la vía PI3K en la activación de LXRα mediada por core y NS5A, sugiriendo un mecanismo específico por el cual el VHC altera el perfil lipídico celular y provoca esteatosis. Tal y como se ha descrito en las células CHL-NS5A y CHL-core, en las células VHC-G1 también se observó una activación de la transcripción de SREBP-1c y FAS mediada por LXRα por activación de los elementos de respuesta LXRE y SRE en el promotor de dichos genes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en diversos estudios en los que se observó una inducción de los genes lipogénicos en sistemas de replicación del VHC que expresaban el genotipo 1b o el 2a (11, 379), a diferencia de los datos obtenidos en pacientes infectados con el genotipo 3 del VHC en los que la esteatosis no estaba asociada a una inducción de dichos genes lipogénicos (380).

De manera similar a lo anteriormente descrito sobre los mecanismos de actuación de las proteínas NS5A y core, la sobreexpresión de LXR α en las células VHC-G1 parece estar mediada por la vía PI3K/AKT. Si bien la lipogénesis mediada por LXR α observada en dichas células podría estar parcialmente inducida por la expresión de las proteínas core y NS5A, otras proteínas, como NS2 o NS4B, podrían contribuir asimismo a la inducción de LXR α y al incremento de la expresión de SREBP-1c y FAS (11, 118, 119). Por ello, parece necesario realizar estudios posteriores para poder determinar el papel de las distintas proteínas del VHC en la modulación del metabolismo lipídico.

Por otra parte, se ha descrito que para la replicación eficiente del VHC se requieren ácidos grasos saturados y monoinsaturados, probablemente al permitir el mantenimiento de una estructura membranosa óptima (8, 379, 381). Así, se ha demostrado que la inhibición de FAS mediante ARN de interferencia disminuye la replicación del VHC tanto en sistemas de replicación como de infección, lo que avala la necesidad de una adecuada función de la vía de síntesis de ácidos grasos para la replicación del VHC (8, 120). De manera similar, se ha descrito que la supresión de SREBP-1c derivada del tratamiento con curcumina inhibe asimismo la replicación del virus en un modelo *in vitro* (346). En el sistema de replicación empleado en el presente estudio, la inhibición de LXRα mediante *siRNA* se acompañó de una reducción del acúmulo lipídico así como de la

expresión de los principales genes lipogénicos. Dicho efecto a su vez se correspondió con el bloqueo parcial de la replicación del VHC y de la expresión de las proteínas core y NS5A. Estos resultados difieren de los obtenidos en un estudio previo en el cual se indicaba que la inhibición de la replicación del VHC por los ácidos grasos poliinsaturados tiene lugar a través de un mecanismo diferente de su habilidad para bloquear LXRa, ya que un tratamiento con T0901317, un agonista de LXR, no modificó la replicación del VHC, ni en condiciones basales ni bajo el efecto inhibidor de los ácidos grasos poliinsaturados (379). Sin embargo, en el presente estudio, el tratamiento llevado a cabo con GW3965, el agonista más específico de LXR (187), dio como resultado un incremento de la expresión de los genes lipogénicos, así como de la replicación del VHC y de la expresión de las proteínas core y NS5A. Además, la modulación de la capacidad de replicación del VHC mediante el agonista parece estar mediada por la activación de LXR α ya que dicho efecto no se observó al tratar con este mismo agonista las células VHC-G1 con el LXRα silenciado. Estos datos sugieren que la regulación del metabolismo lipídico mediada por LXRa puede contribuir a la eficiencia de replicación del VHC.

Dichos resultados sitúan al receptor nuclear LXRα en una posición clave dentro de las vías lipogénicas inducidas por el VHC y sugieren un mecanismo molecular a través del cual la expresión génica del VHC puede estimular la acumulación de lípidos en el hepatocito y a su vez regular la eficiencia de su replicación.

El actual tratamiento estándar aprobado por la FDA para el tratamiento de la hepatitic C crónica es IFNα pegilado combinado con ribavirina (382). Existen evidencias experimentales de que los flavonoides, antioxidantes naturales, muestran un potencial terapéutico en el tratamiento de la hepatitis C mediante la inhibición de la replicación del VHC (16, 17, 383). El presente estudio sugiere por primera vez que la quercetina podría ejercer un efecto inhibidor indirecto sobre la replicación del VHC mediante el bloqueo del estrés oxidativo/nitrosativo y la subsecuente modulación de la lipogénesis mediada por PI3K-LXRα asociada al desarrollo de esteatosis y a la progresión de la hepatitis C.

En nuestro estudio, todos los flavonoides considerados fueron capaces de reducir la eficiencia de replicación del virus C a muy bajas concentraciones. Sin embargo, la quercetina parece ser el modulador más efectivo de la capacidad de replicación del VHC en células que contienen el replicón completo del VHC. Además, se ha descrito previamente que la quercetina muestra actividad antiviral y disminuye la producción de partículas del VHC en cultivo celular (16, 17). Por todo ello, nuestro siguiente objetivo fue estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la replicación del VHC por este flavonol.

En la presente investigación, la quercetina mostró un efecto inhibidor de la replicación del VHC dependiente de la dosis. La expresión de la proteína NS5A, que es esencial para la replicación del virus de la hepatitis C, se redujo también gracias al tratamiento con quercetina, tal y como ya se había descrito en otros estudios (17). Además, la combinación de la quercetina con IFN α provocó un profundo efecto inhibidor sobre la concentración de proteína NS5A y la replicación viral, de manera similar a lo descrito previamente tras un tratamiento combinado de curcumina e IFN α (346). Asimismo, los resultados indicaron por primera vez, un efecto inhibidor de la quercetina sobre la expresión de la proteína core del VHC, mostrando un efecto aditivo cuando se combinó con IFN α .

La principal vía para la generación de una respuesta antiviral mediada por IFN α implica una combinación de diferentes janus quinasas (JAK) y proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT) para dirigir la transcripción de genes estimulados por IFN (384, 385). A este respecto, se ha descrito que la quercetina puede incrementar la expresión génica antiviral regulada por la vía JAK-STAT activada por IFN (386). Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en el efecto inhibidor de la quercetina sobre la replicación del VHC parecen ser más complejos. Así, la quercetina puede inhibir asimismo la activación de la traducción dependiente de IRES mediada por la proteína NS5A del virus (17, 387) y reducir la producción viral a través de la inhibición de NS3 y de las proteínas de choque térmico esenciales para la replicación del virus C (16).

Además de dichos mecanismos moleculares, en el presente estudio se investigó contribución de la modulación del estrés oxidativo/nitrosativo y del metabolismo lipídico en la inhibición de la replicación del VHC mediada por la quercetina.

Como se ha descrito previamente, existe una estrecha relación entre el desarrollo de estrés oxidativo/nitrosativo y la infección del VHC (97, 98, 363, 388). En la presente investigación la quercetina fue capaz de inhibir de manera significativa la formación de EROs y ERNs en células VHC-G1 gracias a su actividad antioxidante. Por otra parte, se ha demostrado que la replicación del VHC induce peroxidación lipídica, lo que a su vez limita la producción de ARN viral (104). En el sistema de replicación del VHC utilizado la quercetina disminuyó la lipoperoxidación inducida por el VHC, pero de manera limitada, manteniendo así su capacidad para inhibir la replicación del virus.

El tratamiento con IFNα también redujo la generación de EROs/ERNs y la peroxidación lipídica inducida por el virus, tal como se había observado en estudios anteriores llevados a cabo en pacientes con hepatitis C crónica (389, 390). Los efectos del IFNα sobre el estado redox parecen ser una consecuencia directa de la reducción de la replicación del VHC (391).

La esteatosis hepática es una de las características histopatológicas más importantes en pacientes con hepatits C crónica. Tanto las proteínas del virus C como factores de la célula hospedadora contribuyen al desarrollo de esteatosis, pudiendo estar involucrados los daños causados por la producción de EROs/ERNs mediante la alteración del metabolismo lipídico (362, 363, 392). Además, diversos estudios sugieren que la biosíntesis de lípidos afecta a la replicación del VHC (120, 379, 393).

Algunos flavonoides presentes en la dieta parecen regular la expresión de genes lipogénicos y la síntesis de ácidos grasos en modelos in vivo e in vitro (394-396). Así, se ha descrito que la guercetina disminuye la síntesis de novo de ácidos grasos y de triglicéridos en hepatocitos de rata (348). En el presente estudio, la quercetina fue capaz de disminuir de manera dependiente de la dosis la acumulación lipídica en las células que expresaban el replicón completo del virus de la hepatitis C, principalmente mediante la reducción del contenido de triglicéridos. Dicho efecto pudo estar mediado, al menos en parte, por la inhibición de la expresión de la proteína core, la cual interfiere con el metabolismo de los triglicéridos (397). Sin embargo, hay una evidencia creciente del papel de la lipotoxicidad no debida a los triglicéridos en la patogénesis de la esteatosis. De hecho, la acumulación de triglicéridos en forma de gotas lipídicas en el hígado podría tener un efecto protector, mientras que los metabolitos derivados de ácidos grasos libres podrían conducir al desarrollo y la evolución de la esteatosis (398). A este respecto, en el presente estudio la guercetina redujo la concentración de ácidos grasos libres, responsables de los efectos lipotóxicos asociados a la esteatosis en las células VHC-G1.

El IFN α 50 también disminuyó la acumulación total de lípidos y de triglicéridos intracelulares, tal y como se había mostrado en trabajos previos en células Huh7 que expresaban proteínas del virus C (399). De manera similar, la concentración de ácidos grasos libres se redujo en presencia de IFN α , tal y como se había descrito previamente en el suero de pacientes infectados con el VHC (400).

Está ampliamente descrito que LXRα es capaz de inducir la expresión de genes lipogénicos involucrados en la síntesis de ácidos grasos, incluyendo su gen diana FAS (366). Tal y como se observó en el presente estudio, la replicación del VHC indujo la acumulación intracelular de lípidos mediada por LXRα, lo que a su

vez contribuye a la eficiente replicación del virus. Por su parte, la quercetina disminuyó significativamente la inducción de LXRα mediada por el VHC y la subsecuente sobreexpresión de FAS a todas las concentraciones probadas. Si bien estudios previos habían descrito la capacidad de varios flavonoides para reducir la expresión de LXRα en células no hepáticas (401-403), los resultados de esta investigación indican por primera vez el papel de la quercetina en la modulación de la expresión génica de LXRα y de la acumulación lipídica tanto en células Huh7 en un modelo de sobreexpresión de LXRα como en las células que incluyen el replicón completo del VHC.

Cabe destacar asimismo el efecto del IFNα en la inhibición de la inducción de FAS mediada por LXRα observado en las células VHC-G1. Una reducción similar de la expresión de FAS causada por IFNα ya se había descrito con anterioridad en modelos *in vitro* de VHC (399). Sin embargo, en el presente estudio el IFNα no fue capaz de disminuir la sobreexpresión del receptor nuclear LXRα en las células Huh7 infectadas con el vector adenoviral, sugiriendo que el efecto del IFNα sobre la modulación de la lipogénesis puede estar mediado indirectamente por su actividad antiviral.

Como se ha indicado previamente, la inhibición de la vía PI3K mediante LY294002 atenuó la sobreexpresión de LXR α inducida por el VHC, lo que supone un mecanismo específico por el cual la infección del VHC altera el perfil lipídico celular y causa esteatosis. Además, la quercetina inhibió de una manera dependiente de la dosis la activación de la vía PI3K/AKT inducida por el VHC, sugiriendo la implicación de la actividad de dicha vía de señalización en la modulación de LXR α mediada por la quercetina. A este respecto, el inhibidor LY294002, que de hecho es un derivado de la quercetina (404), ejerció un efecto inhibidor similar sobre la sobreexpresión de LXR α y la acumulación lipídica mediadas por la capacidad de replicación del VHC, mostrando un efecto aditivo cuando se combinó con quercetina.

Por tanto, la reducción de la síntesis de ácidos grasos mediada por PI3K/AKT-LXRα puede representar un importante mecanismo por el cual la quercetina ejercería su efecto como modulador de la replicación del VHC. De manera similar, se había descrito previamente que la supresión de PI3K/AKT-SREBP-1c por la curcumina conducía a la inhibición de la replicación del VHC en un modelo *in vitro* (346).

En el modelo *in vitro* de sobreexpresión de LXR α empleado en el presente estudio, la quercetina podría ejercer su efecto inhibidor sobre la expresión de LXR α y la acumulación de lípidos no sólo mediante la modulación de la vía PI3K, sino también mediante la expresión de un gran número de miARNs involucrados en la señalización celular y el metabolismo, que a su vez podrían provocar la disminución de la sobreexpresión de LXR α inducida a partir del promotor CMV del vector adenoviral (405). Sin embargo, parecen necesarios estudios posteriores que establecezcan con exactitud los mecanismos moleculares involucrados.

Se ha demostrado previamente que la quercetina es capaz de unirse a PI3K, lo cual resulta en la inhibición de su actividad (406). Por otra parte, se ha sugerido que la expresión génica del VHC induce la activación de la vía PI3K/AKT por medio de estrés oxidativo y la señalización de calcio (11). Las proteínas del virus inducen alteraciones en la homeostasis de calcio mediadas por estrés oxidativo (97), lo cual podría explicar el efecto de la expresión del VHC sobre la vía PI3K/AKT. De hecho, se ha demostrado que la quercetina inhibe el estrés del retículo endoplasmático causado por la desregulación de la homeostasis del calcio mediante la inhibición de PI3K (407). Por lo tanto, la quercetina podría modular la vía PI3K/AKT a través de la reducción de la generación de EROs/ERNs relacionada con la infección del virus de la hepatitis C.

La vía PI3K parece ser un elemento clave en la señalización inducida por IFN (408). De este modo, la vía PI3K/AKT inducida por IFN es la señal esencial para la supervivencia celular y probablemente un mecanismo involucrado en la infección crónica del VHC (408, 409). En el presente estudio, el tratamiento con IFN α fue capaz de interferir con la vía PI3K/AKT tal y como mostró la inducción dependiente de la dosis de la fosforilación de la Ser 473 del AKT. Sin embargo, el tratamiento con inhibidores de PI3K no influyó en la capacidad antiviral del IFN para disminuir la replicación del VHC, indicando que su actividad anti-VHC no es dependiente de PI3K/AKT, tal y como se había descrito previamente (410).

Como conclusión, los resultados de este estudio sugieren que la quercetina podría ejercer su efecto inhibidor sobre la replicación del virus de la hepatitis C, al menos en parte, mediante la inhibición del estrés oxidativo/nitrosativo y la subsecuente modulación del metabolismo lipídico, a través de la reducción de la sobreexpresión de LXRα mediada por PI3K/AKT y de la disminución del acúmulo lipídico asociado al desarrollo de esteatosis y a la progresión de la hepatitis C. De esta manera sería interesente y de importancia en un futuro el desarrollo de estrategias terapéuticas que actúen frente al estrés oxidativo/nitrosativo y frente a la esteatosis asociada en pacientes con hepatitis C.

CONCLUSIONES

Conclusión primera

En los modelos *in vitro* de hepatitis C la expresión de las proteínas NS5A y core, así como la replicación del VHC, estimulan el acúmulo intracelular de lípidos y la sobreexpresión de los principales genes involucrados en la lipogénesis *de novo*, proceso mediado por la inducción de la expresión génica y la activación transcripcional del receptor nuclear LXRα.

Conclusión segunda

El efecto de las proteínas NS5A y core y de la replicación del VHC sobre la activación de LXRα se deriva, al menos en parte, a una regulación indirecta mediada por la activación de la vía de señalización PI3K/AKT, no existiendo una modulación directa relacionada con una interacción física entre el factor nuclear y las proteínas del VHC.

Conclusión tercera

En nuestro modelo *in vitro* de replicación del VHC la modulación del factor nuclear LXRα, mediante el uso de ARN de interferencia y de un agonista específico, regula la expresión de los principales genes lipogénicos, lo que a su vez modifica la propia capacidad de replicación del virus C.

Conclusión cuarta

Los flavonoles quercetina y kaempferol, la flavanona taxifolina y la flavona apigenina son capaces de inhibir la replicación del VHC, siendo la quercetina el inhibidor más efectivo en nuestro modelo *in vitro* de replicación. La quercetina inhibe tanto la replicación del VHC como la expresión de sus proteínas NS5A y core de manera dependiente de la dosis, observándose un efecto aditivo cuando se administra junto con el IFN α -2b.

Conclusión quinta

La quercetina disminuye la producción de EROs y ERNs, la peroxidación lipídica, el acúmulo intracitoplasmático de lípidos y de ácidos grasos libres, y la sobreexpresión de los genes lipogénicos LXR α y FAS inducidos por la replicación del VHC. Asimismo, la quercetina es capaz de reducir la expresión de LXR α , así como el subsecuente incremento del acúmulo lipídico intracitoplasmático, en un sistema de sobreexpresión del mismo mediante un vector adenoviral.

Conclusión sexta

La modulación de la vía de señalización PI3K/AKT, inducida por la replicación del VHC, está implicada en el efecto inhibidor de la quercetina sobre la lipogénesis mediada por LXRα, como mecanismo indirecto mediante el cual el flavonol regula la replicación del VHC.

Conclusión general

El virus de la hepatitis C induce estrés oxidativo y nitrosativo en la célula hospedadora, alterando la lipogénesis regulada por LXRα mediante la vía de señalización PI3K/AKT, contribuyendo así a la esteatosis hepática y favoreciendo la replicación del VHC, proceso que puede ser revertido parcialmente mediante el tratamiento con quercetina.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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(4902): 359-362.

2. **Simmonds P.** Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt 11): 3173-3188.

3. Czepiel J, Biesiada G, Mach T. Viral hepatitis C. Pol Arch Med Wewn 2008; 118(12): 734-740.

4. **Ke PY, Chen SS.** Hepatitis C virus and cellular stress response: Implications to molecular pathogenesis of liver diseases. *Viruses* 2012; 4(10): 2251-2290.

5. Leandro G, Mangia A, Hui J, Fabris P, Rubbia-Brandt L, Colloredo G, Adinolfi LE, et al. Relationship between steatosis, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C: A meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* 2006; 130(6): 1636-1642.

6. Bugianesi E, Leone N, Vanni E, Marchesini G, Brunello F, Carucci P, Musso A, *et al.* Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: From cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2002; 123(1): 134-140.

7. Fujino T, Nakamuta M, Yada R, Aoyagi Y, Yasutake K, Kohjima M, Fukuizumi K, et al. Expression profile of lipid metabolism-associated genes in hepatitis C virus-infected human liver. *Hepatol Res* 2010; 40(9): 923-929.

8. **Su AI, Pezacki JP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, Wieland S, et al.** Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24): 15669-15674.

9. Kim K, Kim KH, Ha E, Park JY, Sakamoto N, Cheong J. Hepatitis C virus NS5A protein increases hepatic lipid accumulation via induction of activation and expression of PPARgamma. *FEBS Lett* 2009; 583(17): 2720-2726.

10. Xiang Z, Qiao L, Zhou Y, Babiuk LA, Liu Q. Hepatitis C virus nonstructural protein-5A activates sterol regulatory element-binding protein-1c through transcription factor Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402(3): 549-553.

11. 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; 81(15): 8122-8130.

12. **Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F.** SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004; 86(11): 839-848.

13. Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, Lee JH, *et al.* Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 2008; 134(2): 556-567.

14. **Felmlee 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; 5(5): 1292-1324.

15. Park HR, Yoon H, Kim MK, Lee SD, Chong Y. Synthesis and antiviral evaluation of 7-Oarylmethylquercetin derivatives against SARS-associated coronavirus (SCV) and hepatitis C virus (HCV). Arch Pharm Res 2012; 35(1): 77-85. 16. Bachmetov L, Gal-Tanamy M, Shapira A, Vorobeychik M, Giterman-Galam T, Sathiyamoorthy P, Golan-Goldhirsh A, *et al.* Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *J Viral Hepat* 2012; 19(2): e81-8.

17. Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, Arumugaswami V, Sun R, *et al.* The heat shock protein inhibitor quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 2009; 50(6): 1756-1764.

18. **Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H.** Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(4): 530-540.

19. **Aguilera Guirao A, Romero Yuste S, Regueiro BJ.** Epidemiology and clinical manifestations of viral hepatitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(4): 264-276.

20. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1): S35-46.

21. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(2): 107-115.

22. Wendt A, Adhoute X, Castellani P, Oules V, Ansaldi C, Benali S, Bourliere M. Chronic hepatitis C: Future treatment. *Clin Pharmacol* 2014; 6: 1-17.

23. **Vietri J, Prajapati G, El Khoury AC.** The burden of hepatitis C in europe from the patients' perspective: A survey in 5 countries. *BMC Gastroenterol* 2013; 13: 16-230X-13-16.

24. **Fernández-Yunquera A, Rincon D, Salcedo M, Banares R.** Update on the use of direct-acting antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Rev Esp Quimioter* 2013; 26(3): 189-192.

25. Karoney MJ, Siika AM. Hepatitis C virus (HCV) infection in africa: A review. Pan Afr Med J 2013; 14: 44.

26. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: Detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23(2): 205-209.

27. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, Gojobori T, *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: Proposals for standardization. international committee on virus taxonomy. *Arch Virol* 1998; 143(12): 2493-2503.

28. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA* 2001; 7(5): 710-721.

29. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. World J Gastroenterol 2007; 13(17): 2406-2415.

30. **Steinmann E, Penin F, Kallis S, Patel AH, Bartenschlager R, Pietschmann T.** Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog* 2007; 3(7): e103.

31. Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM, Shanmugam S, Singh SM, Lemon SM, Yi M. Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol* 2011; 85(1): 86-97.

32. Appel N, Zayas M, Miller S, Krijnse-Locker J, Schaller T, Friebe P, Kallis S, *et al.* Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 2008; 4(3): e1000035.

33. You S, Stump DD, Branch AD, Rice CM. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004; 78(3): 1352-1366.

34. **Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU.** A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 1998; 12(1): 67-83.

35. **Díaz-Toledano R, Ariza-Mateos A, Birk A, Martínez-García B, Gómez J.** In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(16): 5498-5510.

36. **Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, Ciczora Y, Cocquerel L, Keck Z, Foung S**, *et al.* Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol* 2004; 78(6): 2994-3002.

37. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2006; 80(14): 6964-6972.

38. **Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA.** Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(12): 7271-7276.

39. Koutsoudakis G, Kaul A, Steinmann E, Kallis S, Lohmann V, Pietschmann T, Bartenschlager R. Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses. *J Virol* 2006; 80(11): 5308-5320.

40. **Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M,Jr.** Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 2009; 394(1): 99-108.

41. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 2002; 21(19): 5017-5025.

42. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282(5390): 938-941.

43. Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 2009; 83(4): 2011-2014.

44. Ploss A, Evans MJ. Hepatitis C virus host cell entry. Curr Opin Virol 2012; 2(1): 14-19.

45. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76(12): 5974-5984.

46. **Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, et al.** Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host Microbe* 2011; 9(1): 32-45.

47. Foster TL, Gallay P, Stonehouse NJ, Harris M. Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner. *J Virol* 2011; 85(14): 7460-7464.

48. **Coelmont L, Hanoulle X, Chatterji U, Berger C, Snoeck J, Bobardt M, Lim P, et al.** DEB025 (alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A. *PLoS One* 2010; 5(10): e13687.

49. Popescu CI, Rouille Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus assembly imaging. *Viruses* 2011; 3(11): 2238-2254.

50. **Targett-Adams P, Hope G, Boulant S, McLauchlan J.** Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *J Biol Chem* 2008; 283(24): 16850-16859.

51. Coller KE, Heaton NS, Berger KL, Cooper JD, Saunders JL, Randall G. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion. *PLoS Pathog* 2012; 8(1): e1002466.

52. Lai CK, Jeng KS, Machida K, Lai MM. Hepatitis C virus egress and release depend on endosomal trafficking of core protein. *J Virol* 2010; 84(21): 11590-11598.

53. **Timpe JM, Stamataki Z, Jennings A, Hu K, Farquhar MJ, Harris HJ, Schwarz A**, *et al.* Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 2008; 47(1): 17-24.

54. **Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E.** A new genotype of hepatitis C virus originating from central africa. *Hepatology* 2007; 46(4): 623A.

55. **Farci P, Purcell RH.** Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 2000; 20(1): 103-126.

56. Yun Z, Lara C, Johansson B, Lorenzana de Rivera I, Sonnerborg A. Discrepancy of hepatitis C virus genotypes as determined by phylogenetic analysis of partial NS5 and core sequences. *J Med Virol* 1996; 49(3): 155-160.

57. **Viazov S, Widell A, Nordenfelt E.** Mixed infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event. *Infection* 2000; 28(1): 21-25.

58. **Demetriou VL, Kyriakou E, Kostrikis LG.** Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant hepatitis C virus isolates. *Adv Virol* 2011; 2011: 710438.

59. **Morel V, Descamps V, Francois C, Fournier C, Brochot E, Capron D, Duverlie G**, *et al.* Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed hepatitis C infection: A case report. *J Clin Virol* 2010; 47(4): 382-386.

60. Yokoyama K, Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Yotsumoto S, Okamoto H, *et al.* Identification and characterization of a natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant hepatitis C virus in japan. *Arch Virol* 2011; 156(9): 1591-1601.

61. **Ron D, Walter P.** Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(7): 519-529.

62. Li S, Ye L, Yu X, Xu B, Li K, Zhu X, Liu H, *et al.* Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF-kappaB activation. *Virology* 2009; 391(2): 257-264.

63. **Zhao P, Han T, Guo JJ, Zhu SL, Wang J, Ao F, Jing MZ**, *et al*. HCV NS4B induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. *Virus Res* 2012; 169(1): 1-7.

64. von dem Bussche A, Machida R, Li K, Loevinsohn G, Khander A, Wang J, Wakita T, *et al.* Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *J Hepatol* 2010; 53(5): 797-804.

65. **Chan SW, Egan PA.** Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response. *FASEB J* 2005; 19(11): 1510-1512.

66. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 2008; 132(1): 27-42.

67. **Ke PY, Chen SS.** Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest* 2011; 121(1): 37-56.

68. **Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K.** Knockdown of autophagyrelated gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy* 2009; 5(7): 937-945.

69. **Richard A, Tulasne D.** Caspase cleavage of viral proteins, another way for viruses to make the best of apoptosis. *Cell Death Dis* 2012; 3: e277.

70. Varfolomeev EE, Ashkenazi A. Tumor necrosis factor: An apoptosis JuNKie? *Cell* 2004; 116(4): 491-497.

71. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 95-118.

72. Benali-Furet NL, Chami M, Houel L, De Giorgi F, Vernejoul F, Lagorce D, Buscail L, *et al.* Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene* 2005; 24(31): 4921-4933.

73. **Chiou HL, Hsieh YS, Hsieh MR, Chen TY.** HCV E2 may induce apoptosis of huh-7 cells via a mitochondrial-related caspase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(1): 453-458.

74. Ciccaglione AR, Marcantonio C, Costantino A, Equestre M, Rapicetta M. Expression of HCV E1 protein in baculovirus-infected cells: Effects on cell viability and apoptosis induction. *Intervirology* 2003; 46(2): 121-126.

75. Nomura-Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Kitazawa S, Ishido S, Sada K, Hotta H. Nonstructural protein 4A of hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol* 2006; 87(Pt 7): 1935-1945.

76. **Prikhod'ko EA, Prikhod'ko GG, Siegel RM, Thompson P, Major ME, Cohen JI.** The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities. *Virology* 2004; 329(1): 53-67.

77. **Siavoshian S, Abraham JD, Thumann C, Kieny MP, Schuster C.** Hepatitis C virus core, NS3, NS5A, NS5B proteins induce apoptosis in mature dendritic cells. *J Med Virol* 2005; 75(3): 402-411.

78. **Ray RB, Meyer K, Steele R, Shrivastava A, Aggarwal BB, Ray R.** Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998; 273(4): 2256-2259.

79. Lee SH, Kim YK, Kim CS, Seol SK, Kim J, Cho S, Song YL, et al. E2 of hepatitis C virus inhibits apoptosis. *J Immunol* 2005; 175(12): 8226-8235.

80. Tanaka M, Nagano-Fujii M, Deng L, Ishido S, Sada K, Hotta H. Single-point mutations of hepatitis C virus NS3 that impair p53 interaction and anti-apoptotic activity of NS3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340(3): 792-799.

81. Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, et al. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002; 21(31): 4801-4811.

82. Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Le Seyec J, Gilot D, Cannie I, Gripon P, *et al.* The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278(20): 18256-18264.

83. Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, *et al.* Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase 3-dependent pathway. *J Virol* 2008; 82(21): 10375-10385.

84. Deng Z, Yan H, Hu J, Zhang S, Peng P, Liu Q, Guo D. Hepatitis C virus sensitizes host cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating DR4 and DR5 via a MEK1-dependent pathway. *PLoS One* 2012; 7(5): e37700.

85. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 295-312.

86. **Zhao RY, Elder RT.** Viral infections and cell cycle G2/M regulation. *Cell Res* 2005; 15(3): 143-149.

87. Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Activation of RB/E2F signaling pathway is required for the modulation of hepatitis C virus core protein-induced cell growth in liver and non-liver cells. *Cell Signal* 2004; 16(12): 1375-1385.

88. **Munakata T, Liang Y, Kim S, McGivern DR, Huibregtse J, Nomoto A, Lemon SM.** Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein. *PLoS Pathog* 2007; 3(9): 1335-1347.

89. Bittar C, Shrivastava S, Bhanja Chowdhury J, Rahal P, Ray RB. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits DNA damage pathway by sequestering p53 to the cytoplasm. *PLoS One* 2013; 8(4): e62581.

90. Lai CK, Jeng KS, Machida K, Cheng YS, Lai MM. Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Virology* 2008; 370(2): 295-309.

91. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007; 26(22): 3279-3290.

92. Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL, Mayer BJ, *et al.* NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(10): 5533-5538.

93. **Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M.** The hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2004; 279(13): 12232-12241.

94. **Cheng D, Zhao L, Zhang L, Jiang Y, Tian Y, Xiao X, Gong G.** p53 controls hepatitis C virus nonstructural protein 5A-mediated downregulation of GADD45alpha expression via the NF-kappaB and PI3K-akt pathways. *J Gen Virol* 2013; 94(Pt 2): 326-335.

95. **Goldenthal MJ, Marín-García J.** Mitochondrial signaling pathways: A receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem* 2004; 262(1-2): 1-16.

96. **Chu VC, Bhattacharya S, Nomoto A, Lin J, Zaidi SK, Oberley TD, Weinman SA**, *et al.* Persistent expression of hepatitis C virus non-structural proteins leads to increased autophagy and mitochondrial injury in human hepatoma cells. *PLoS One* 2011; 6(12): e28551.

97. Dionisio N, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Majano PL, Benedicto I, Rosado JA, Salido GM, *et al.* Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signalling alterations in hepatocytes. *J Hepatol* 2009; 50(5): 872-882.

98. García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, González-Pérez P, Gómez-Gonzalo M, Majano PL, López-Cabrera M, Clemente G, et al. Differential contribution of hepatitis C virus NS5A and core proteins to the induction of oxidative and nitrosative stress in human hepatocyte-derived cells. J Hepatol 2005; 43(4): 606-613.

99. Kaufman RJ, Malhotra JD. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 2014; .

100. **Piccoli C, Scrima R, Quarato G, D'Aprile A, Ripoli M, Lecce L, Boffoli D**, *et al.* Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. *Hepatology* 2007; 46(1): 58-65.

101. Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(17): 9599-9604.

102. Waris G, Turkson J, Hassanein T, Siddiqui A. Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: Role of STAT-3 in HCV replication. *J Virol* 2005; 79(3): 1569-1580.

103. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006; 10(2): 389-406.

104. **Huang H, Chen Y, Ye J.** Inhibition of hepatitis C virus replication by peroxidation of arachidonate and restoration by vitamin E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(47): 18666-18670.

105. Haller O, Weber F. Pathogenic viruses: Smart manipulators of the interferon system. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007; 316: 315-334.

106. **Steer SA, Corbett JA.** The role and regulation of COX-2 during viral infection. *Viral Immunol* 2003; 16(4): 447-460.

107. **Íñiguez MA, Martínez-Martínez S, Punzón C, Redondo JM, Fresno M.** An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 2000; 275(31): 23627-23635.

108. **Waris G, Siddiqui A.** Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: Role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J Virol* 2005; 79(15): 9725-9734.

109. **Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D.** Dephosphorylation of translation initiation factor 2alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab* 2008; 7(6): 520-532.

110. Bobrovnikova-Marjon E, Hatzivassiliou G, Grigoriadou C, Romero M, Cavener DR, Thompson CB, Diehl JA. PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(42): 16314-16319.

111. **Brodsky JL, Fisher EA.** The many intersecting pathways underlying apolipoprotein B secretion and degradation. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19(7): 254-259.

112. **Kodama Y, Brenner DA.** c-jun N-terminal kinase signaling in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: Multiple roles in multiple steps. *Hepatology* 2009; 49(1): 6-8.

113. Korenaga M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, Sun J, Weinman SA. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 2005; 280(45): 37481-37488.

114. Roingeard P. Hepatitis C virus diversity and hepatic steatosis. *J Viral Hepat* 2013; 20(2): 77-84.

115. Woodhouse SD, Narayan R, Latham S, Lee S, Antrobus R, Gangadharan B, Luo S, *et al.* Transcriptome sequencing, microarray, and proteomic analyses reveal cellular and metabolic impact of hepatitis C virus infection in vitro. *Hepatology* 2010; 52(2): 443-453.

116. **Mankouri J, Tedbury PR, Gretton S, Hughes ME, Griffin SD, Dallas ML, Green KA**, *et al.* Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(25): 11549-11554.

117. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109(9): 1125-1131.

118. **Oem JK, Jackel-Cram C, Li YP, Zhou Y, Zhong J, Shimano H, Babiuk LA**, *et al*. Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 5): 1225-1230.

119. **Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB.** Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem* 2009; 284(14): 9237-9246.

120. Yang W, Hood BL, Chadwick SL, Liu S, Watkins SC, Luo G, Conrads TP, *et al.* Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology* 2008; 48(5): 1396-1403.

121. Dharancy S, Malapel M, Perlemuter G, Roskams T, Cheng Y, Dubuquoy L, Podevin P, *et al.* Impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha during hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2005; 128(2): 334-342.

122. Clément S, Peyrou M, Sanchez-Pareja A, Bourgoin L, Ramadori P, Suter D, Vinciguerra M, *et al.* Down-regulation of phosphatase and tensin homolog by hepatitis C virus core 3a in hepatocytes triggers the formation of large lipid droplets. *Hepatology* 2011; 54(1): 38-49.
123. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19(1): 92-105.

124. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; 11(3): 228-234.

125. Li ZY, Xi Y, Zhu WN, Zeng C, Zhang ZQ, Guo ZC, Hao DL, *et al.* Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4alpha. *J Hepatol* 2011; 55(3): 602-611.

126. **Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, Huang Y, et al.** MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 2012; 122(8): 2884-2897.

127. Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, *et al.* Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(31): 12884-12889.

128. **Roberts AP, Lewis AP, Jopling CL.** miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(17): 7716-7729.

129. **Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M.** Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 2007; 449(7164): 919-922.

130. Cheng JC, Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, Sakamoto N, Huang HD. Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(15): 2621-2633.

131. **Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K.** Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 2009; 50(3): 453-460.

132. Hou W, Tian Q, Zheng J, Bonkovsky HL. MicroRNA-196 represses Bach1 protein and hepatitis C virus gene expression in human hepatoma cells expressing hepatitis C viral proteins. *Hepatology* 2010; 51(5): 1494-1504.

133. Bandyopadhyay S, Friedman RC, Marquez RT, Keck K, Kong B, Icardi MS, Brown KE, et al. Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation downregulate miR-29: MiR-29 overexpression reduces hepatitis C viral abundance in culture. J Infect Dis 2011; 203(12): 1753-1762.

134. **Bhanja Chowdhury J, Shrivastava S, Steele R, Di Bisceglie AM, Ray R, Ray RB.** Hepatitis C virus infection modulates expression of interferon stimulatory gene IFITM1 by upregulating miR-130A. *J Virol* 2012; 86(18): 10221-10225.

135. Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells. *Virology* 2010; 398(1): 57-67.

136. Irshad M, Mankotia DS, Irshad K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2013; 19(44): 7896-7909.

137. Irshad M, Ansari MA, Irshad K, Lingaiah R. Novel single-step multiplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous quantification of hepatitis virus A, B, C, and E in serum. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28(12): 1869-1876.

138. Yang JH, Lai JP, Douglas SD, Metzger D, Zhu XH, Ho WZ. Real-time RT-PCR for quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Virol Methods* 2002; 102(1-2): 119-128.

139. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, American Association for Study of Liver Diseases. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the american association for the study of liver diseases. *Hepatology* 2011; 54(4): 1433-1444.

140. Foster GR, Hezode C, Bronowicki JP, Carosi G, Weiland O, Verlinden L, van Heeswijk R, *et al.* Telaprevir alone or with peginterferon and ribavirin reduces HCV RNA in patients with chronic genotype 2 but not genotype 3 infections. *Gastroenterology* 2011; 141(3): 881-889.e1.

141. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, *et al.* Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010; 327(5962): 198-201.

142. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013; 368(18): 1685-1694.

143. Harrison SA, Rossaro L, Hu KQ, Patel K, Tillmann H, Dhaliwal S, Torres DM, *et al.* Serum cholesterol and statin use predict virological response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatology* 2010; 52(3): 864-874.

144. Forde KA, Law C, O'Flynn R, Kaplan DE. Do statins reduce hepatitis C RNA titers during routine clinical use? *World J Gastroenterol* 2009; 15(40): 5020-5027.

145. **Sezaki H, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Kobayashi M, Suzuki Y**, *et al*. An open pilot study exploring the efficacy of fluvastatin, pegylated interferon and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1b in high viral loads. *Intervirology* 2009; 52(1): 43-48.

146. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006; 3(2): 87-98.

147. Romero-Gómez M, Diago M, Andrade RJ, Calleja JL, Salmerón J, Fernández-Rodríguez CM, Solà R, *et al.* Treatment of insulin resistance with metformin in naive genotype 1 chronic hepatitis C patients receiving peginterferon alfa-2a plus ribavirin. *Hepatology* 2009; 50(6): 1702-1708.

148. **Chojkier M, Elkhayat H, Sabry D, Donohue M, Buck M.** Pioglitazone decreases hepatitis C viral load in overweight, treatment naive, genotype 4 infected-patients: A pilot study. *PLoS One* 2012; 7(3): e31516.

149. Goldwasser J, Cohen PY, Lin W, Kitsberg D, Balaguer P, Polyak SJ, Chung RT, et al. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. *J Hepatol* 2011; 55(5): 963-971.

150. Calland N, Albecka A, Belouzard S, Wychowski C, Duverlie G, Descamps V, Hober D, *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2012; 55(3): 720-729.

151. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285(5424): 110-113.

152. Bartenschlager R, Sparacio S. Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res* 2007; 127(2): 195-207.

153. **Podevin P, Carpentier A, Pène V, Aoudjehane L, Carrière M, Zaïdi S, Hernandez C, et al.** Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 2010; 139(4): 1355-1364.

154. **Burlone ME, Budkowska A.** Hepatitis C virus cell entry: Role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 2009; 90(Pt 5): 1055-1070.

155. **Muchmore E, Popper H, Peterson DA, Miller MF, Lieberman HM.** Non-A, non-B hepatitisrelated hepatocellular carcinoma in a chimpanzee. *J Med Primatol* 1988; 17(5): 235-246.

156. **Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, et al.** Pathogenesis of hepatitis C virus infection in tupaia belangeri. *J Virol* 2010; 84(1): 303-311.

157. **Dorner M, Horwitz JA, Robbins JB, Barry WT, Feng Q, Mu K, Jones CT**, *et al.* A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 2011; 474(7350): 208-211.

158. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, *et al.* Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; 7(8): 927-933.

159. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, *et al.* Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *J Gen Virol* 2010; 91(Pt 7): 1668-1677.

160. **Ouyang EC, Wu CH, Walton C, Promrat K, Wu GY.** Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7(3): 324-330.

161. Machado M, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9(5): 637-642.

162. **Tilg H, Moschen AR.** Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52(5): 1836-1846.

163. **Charlton M.** Nonalcoholic fatty liver disease: A review of current understanding and future impact. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2(12): 1048-1058.

164. **Vernon G, Baranova A, Younossi ZM.** Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34(3): 274-285.

165. **Farrell GC, Larter CZ.** Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1): S99-S112.

166. **Koo SH.** Nonalcoholic fatty liver disease: Molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* 2013; 19(3): 210-215.

167. **Neuschwander-Tetri BA.** Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010; 52(2): 774-788.

168. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41(6): 1313-1321.

169. Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. J Gastroenterol Hepatol 2013; 28 Suppl 4: 64-70.

170. **Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T.** Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18(19): 2300-2308.

171. **Strnad P, Zatloukal K, Stumptner C, Kulaksiz H, Denk H.** Mallory-denk-bodies: Lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782(12): 764-774.

172. Basaranoglu M, Turhan N, Sonsuz A, Basaranoglu G. Mallory-denk bodies in chronic hepatitis. *World J Gastroenterol* 2011; 17(17): 2172-2177.

173. **Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ.** Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1413-1419.

174. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(9): 2467-2474.

175. **Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS.** Central role for liver X receptor in insulinmediated activation of srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(31): 11245-11250.

176. **Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S, Griffiths JR**, *et al.* SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to akt-dependent cell growth. *Cell Metab* 2008; 8(3): 224-236.

177. Lu M, Shyy JY. Sterol regulatory element-binding protein 1 is negatively modulated by PKA phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(6): C1477-86.

178. **Yoon YS, Seo WY, Lee MW, Kim ST, Koo SH.** Salt-inducible kinase regulates hepatic lipogenesis by controlling SREBP-1c phosphorylation. *J Biol Chem* 2009; 284(16): 10446-10452.

179. **Uyeda K, Repa JJ.** Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006; 4(2): 107-110.

180. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, Girard J, *et al.* Liverspecific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 2006; 55(8): 2159-2170.

181. **Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD.** Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999; 274(42): 30028-30032.

182. **Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M.** A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol* 1994; 14(10): 7025-7035.

183. **Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J.** Liver X receptors (LXRs). part I: Structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007; 61: 736-759.

184. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. J Biol Chem 1997; 272(6): 3137-3140.

185. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreusch A, *et al.* The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 2007; 445(7124): 219-223.

186. Anthonisen EH, Berven L, Holm S, Nygard M, Nebb HI, Gronning-Wang LM. Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *J Biol Chem* 2010; 285(3): 1607-1615.

187. **Mitro N, Vargas L, Romeo R, Koder A, Saez E.** T0901317 is a potent PXR ligand: Implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett* 2007; 581(9): 1721-1726.

188. Gan X, Kaplan R, Menke JG, MacNaul K, Chen Y, Sparrow CP, Zhou G, *et al.* Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J Biol Chem* 2001; 276(52): 48702-48708.

189. **Song C, Hiipakka RA, Liao S.** Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: Implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 2001; 66(6): 473-479.

190. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 2002; 277(3): 1705-1711.

191. **Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf DJ, Jump DB.** The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278(42): 40736-40743.

192. Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL, Tontonoz P. Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol* 2001; 21(22): 7558-7568.

193. **Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb HI.** Tissue-specific autoregulation of the LXRalpha gene facilitates induction of apoE in mouse adipose tissue. *J Lipid Res* 2004; 45(11): 2052-2062.

194. Tobin KA, Ulven SM, Schuster GU, Steineger HH, Andresen SM, Gustafsson JA, Nebb HI. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 2002; 277(12): 10691-10697.

195. **Yamamoto T, Shimano H, Inoue N, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Takahashi A, Yahagi N**, *et al.* Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J Biol Chem* 2007; 282(16): 11687-11695.

196. **Goodwin B, Watson MA, Kim H, Miao J, Kemper JK, Kliewer SA.** Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 2003; 17(3): 386-394.

197. Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003; 278(18): 15565-15570.

198. **Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, Staels B**, *et al.* Niemann-pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340(4): 1259-1263.

199. **Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A.** Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761(7): 655-666.

200. Bories G, Colin S, Vanhoutte J, Derudas B, Copin C, Fanchon M, Daoudi M, et al. Liver X receptor activation stimulates iron export in human alternative macrophages. *Circ Res* 2013; 113(11): 1196-1205.

201. **Cha JY, Repa JJ.** The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. the carbohydrateresponse element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007; 282(1): 743-751.

202. Jeon TI, Osborne TF. SREBPs: Metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(2): 65-72.

203. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, *et al.* Crucial step in cholesterol homeostasis: Sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 2002; 110(4): 489-500.

204. **Sato R, Miyamoto W, Inoue J, Terada T, Imanaka T, Maeda M.** Sterol regulatory elementbinding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J Biol Chem* 1999; 274(35): 24714-24720.

205. **Bist A, Fielding PE, Fielding CJ.** Two sterol regulatory element-like sequences mediate upregulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(20): 10693-10698.

206. **Bennett MK, Osborne TF.** Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: Increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(12): 6340-6344.

207. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(22): 12737-12742.

208. **Kidani Y, Bensinger SJ.** Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity. *Immunol Rev* 2012; 249(1): 72-83.

209. **Desvergne B, Wahli W.** Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20(5): 649-688.

210. **Coll T, Rodríguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Eyre E, Palomer X, Vázquez-Carrera M.** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: A new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Mol Pharmacol* 2009; 2(1): 46-55.

211. Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 341-367.

212. Lalloyer F, Staels B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(5): 894-899.

213. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, *et al.* Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003; 278(36): 34268-34276.

214. **Arner P.** Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19(4): 471-482.

215. **Doege H, Stahl A.** Protein-mediated fatty acid uptake: Novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 259-268.

216. Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, Laitinen S, et al. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294(5): G1281-7.

217. Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, Arkkila P, Siren J, Hamsten A, Fisher RM, *et al.* Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes* 2007; 56(11): 2759-2765.

218. Guzmán C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, García-Mediavilla MV, Martínez-Chantar ML, González-Gallego J, *et al.* The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPARalpha; and repressed by C/EBPalpha: Implications in FABP1 downregulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831(4): 803-818.

219. Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 1996; 320 (Pt 2): 345-357.

220. Tolwani RJ, Hamm DA, Tian L, Sharer JD, Vockley J, Rinaldo P, Matern D, et al. Mediumchain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in gene-targeted mice. *PLoS Genet* 2005; 1(2): e23.

221. **Munday MR.** Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6): 1059-1064.

222. **Choi SH, Ginsberg HN.** Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22(9): 353-363.

223. **Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI.** MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *J Lipid Res* 2010; 51(6): 1513-1523.

224. Gerin I, Bommer GT, McCoin CS, Sousa KM, Krishnan V, MacDougald OA. Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299(2): E198-206.

225. Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 52361-52365.

226. Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Yun Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J* 2009; 276(8): 2348-2358.

227. Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, Yahagi N, *et al.* The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385(4): 492-496.

228. Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Naar AM. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328(5985): 1566-1569.

229. Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, Leclercq IA, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 2010; 285(44): 33652-33661.

230. Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology* 2001; 33(6): 1358-1364.

231. Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, Whitehall VH, Shorthouse C, Clouston A, Powell EE. Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 1999; 29(4): 1215-1219.

232. **Dienes HP, Popper H, Arnold W, Lobeck H.** Histologic observations in human hepatitis non-A, non-B. *Hepatology* 1982; 2(5): 562-571.

233. **Koike K.** Steatosis, liver injury, and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection. *J Gastroenterol* 2009; 44 Suppl 19: 82-88.

234. **Mirandola S, Realdon S, Iqbal J, Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G, Marcolongo M, et al.** Liver microsomal triglyceride transfer protein is involved in hepatitis C liver steatosis. *Gastroenterology* 2006; 130(6): 1661-1669.

235. Enjoji M, Kohjima M, Kotoh K, Nakamuta M. Metabolic disorders and steatosis in patients with chronic hepatitis C: Metabolic strategies for antiviral treatments. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 264017.

236. Marzouk D, Sass J, Bakr I, El Hosseiny M, Abdel-Hamid M, Rekacewicz C, Chaturvedi N, *et al.* Metabolic and cardiovascular risk profiles and hepatitis C virus infection in rural egypt. *Gut* 2007; 56(8): 1105-1110.

237. Jung HJ, Kim YS, Kim SG, Lee YN, Jeong SW, Jang JY, Lee SH, *et al.* The impact of pegylated interferon and ribavirin combination treatment on lipid metabolism and insulin resistance in chronic hepatitis C patients. *Clin Mol Hepatol* 2014; 20(1): 38-46.

238. Westin J, Lagging M, Dhillon AP, Norkrans G, Romero AI, Pawlotsky JM, Zeuzem S, *et al.* Impact of hepatic steatosis on viral kinetics and treatment outcome during antiviral treatment of chronic HCV infection. *J Viral Hepat* 2007; 14(1): 29-35.

239. Kaser S, Ebenbichler CF, Tilg H. Pharmacological and non-pharmacological treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Pract* 2010; 64(7): 968-983.

240. Dunn W, Angulo P, Sanderson S, Jamil LH, Stadheim L, Rosen C, Malinchoc M, *et al.* Utility of a new model to diagnose an alcohol basis for steatohepatitis. *Gastroenterology* 2006; 131(4): 1057-1063.

241. **Iijima H, Moriyasu F, Tsuchiya K, Suzuki S, Yoshida M, Shimizu M, Sasaki S**, *et al.* Decrease in accumulation of ultrasound contrast microbubbles in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2007; 37(9): 722-730.

242. **Torres DM, Harrison SA.** Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008; 134(6): 1682-1698.

243. **Huang MA, Greenson JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, Emick D**, *et al.* Oneyear intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(5): 1072-1081.

244. **Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ.** Comparative review of diets for the metabolic syndrome: Implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(2): 285-300.

245. Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. *Hepatology* 2009; 49(1): 80-86.

246. **Vemuri VK, Janero DR, Makriyannis A.** Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: Drugs for obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 2008; 93(4-5): 671-686.

247. **Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, Serriere-Lanneau V,** *et al.* CB1 cannabinoid receptor antagonism: A new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006; 12(6): 671-676.

248. **Stuart SA, Butler P, Munafo MR, Nutt DJ, Robinson ES.** A translational rodent assay of affective biases in depression and antidepressant therapy. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(9): 1625-1635.

249. Sears D, Fillmore G, Bui M, Rodriguez J. Evaluation of gastric bypass patients 1 year after surgery: Changes in quality of life and obesity-related conditions. *Obes Surg* 2008; 18(12): 1522-1525.

250. Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. N Engl J Med 2004; 351(26): 2683-2693.

251. **Tessier DJ, Eagon JC.** Surgical management of morbid obesity. *Curr Probl Surg* 2008; 45(2): 68-137.

252. **Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygari S, Sood GK.** Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6(12): 1396-1402.

253. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: An update. Ann Intern Med 2002; 137(1): 25-33.

254. **Riera-Guardia N, Rothenbacher D.** The effect of thiazolidinediones on adiponectin serum level: A meta-analysis. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10(5): 367-375.

255. **Scheen AJ.** Hepatotoxicity with thiazolidinediones: Is it a class effect? *Drug Saf* 2001; 24(12): 873-888.

256. Lutchman G, Modi A, Kleiner DE, Promrat K, Heller T, Ghany M, Borg B, *et al.* The effects of discontinuing pioglitazone in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 46(2): 424-429.

257. **Nissen SE, Wolski K.** Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007; 356(24): 2457-2471.

258. **Zhang S, Wang J, Liu Q, Harnish DC.** Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009; 51(2): 380-388.

259. **Gómez-Domínguez E, Gisbert JP, Moreno-Monteagudo JA, García-Buey L, Moreno-Otero R.** A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipemid, non-alcoholic fatty liver patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(11): 1643-1647. 260. **Nelson A, Torres DM, Morgan AE, Fincke C, Harrison SA.** A pilot study using simvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: A randomized placebo-controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43(10): 990-994.

261. **Filippatos TD.** A review of time courses and predictors of lipid changes with fenofibric acidstatin combination. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012; 26(3): 245-255.

262. **Hamilton SJ, Chew GT, Davis TM, Watts GF.** Fenofibrate improves endothelial function in the brachial artery and forearm resistance arterioles of statin-treated type 2 diabetic patients. *Clin Sci (Lond)* 2010; 118(10): 607-615.

263. Koh KK, Quon MJ, Shin KC, Lim S, Lee Y, Sakuma I, Lee K, *et al.* Significant differential effects of omega-3 fatty acids and fenofibrate in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 2012; 220(2): 537-544.

264. **Satapathy SK, Sakhuja P, Malhotra V, Sharma BC, Sarin SK.** Beneficial effects of pentoxifylline on hepatic steatosis, fibrosis and necroinflammation in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(5): 634-638.

265. Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, *et al.* Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: Results of a randomized trial. *Hepatology* 2004; 39(3): 770-778.

266. Matthew Morris E, Fletcher JA, Thyfault JP, Rector RS. The role of angiotensin II in nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 378(1-2): 29-40.

267. Kudo H, Yata Y, Takahara T, Kawai K, Nakayama Y, Kanayama M, Oya T, *et al.* Telmisartan attenuates progression of steatohepatitis in mice: Role of hepatic macrophage infiltration and effects on adipose tissue. *Liver Int* 2009; 29(7): 988-996.

268. Kaji K, Yoshiji H, Kitade M, Ikenaka Y, Noguchi R, Shirai Y, Aihara Y, *et al.* Combination treatment of angiotensin II type I receptor blocker and new oral iron chelator attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300(6): G1094-104.

269. Malaguarnera M, Gargante MP, Russo C, Antic T, Vacante M, Malaguarnera M, Avitabile T, *et al.* L-carnitine supplementation to diet: A new tool in treatment of nonalcoholic steatohepatitis--a randomized and controlled clinical trial. *Am J Gastroenterol* 2010; 105(6): 1338-1345.

270. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(11): 2485-2490.

271. Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, García-Urkia N, Sarasqueta C, *et al.* Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 40-230X-8-40.

272. **Park HJ, DiNatale DA, Chung MY, Park YK, Lee JY, Koo SI, O'Connor M**, *et al.* Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice. *J Nutr Biochem* 2011; 22(4): 393-400.

273. Xiao J, Ching YP, Liong EC, Nanji AA, Fung ML, Tipoe GL. Garlic-derived Sallylmercaptocysteine is a hepato-protective agent in non-alcoholic fatty liver disease in vivo animal model. *Eur J Nutr* 2013; 52(1): 179-191. 274. **Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Masciana R, et al.** Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49(6): 1877-1887.

275. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, Del Vecchio Blanco C. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39(6): 540-543.

276. **Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J**, *et al.* Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; 121(3): 580-591.

277. Kanuri G, Bergheim I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* 2013; 14(6): 11963-11980.

278. Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, Considine RV. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003; 98(12): 2771-2776.

279. Wortham M, He L, Gyamfi M, Copple BL, Wan YJ. The transition from fatty liver to NASH associates with SAMe depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. *Dig Dis Sci* 2008; 53(10): 2761-2774.

280. **Oana F, Takeda H, Hayakawa K, Matsuzawa A, Akahane S, Isaji M, Akahane M.** Physiological difference between obese (fa/fa) zucker rats and lean zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism* 2005; 54(8): 995-1001.

281. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 2000; 106(2): 253-262.

282. Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, Tanaka M, Yamamoto Y, Kamei Y, Terai S, *et al.* Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 2011; 179(5): 2454-2463.

283. Nakayama H, Otabe S, Ueno T, Hirota N, Yuan X, Fukutani T, Hashinaga T, *et al.* Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* 2007; 56(4): 470-475.

284. Sato W, Horie Y, Kataoka E, Ohshima S, Dohmen T, lizuka M, Sasaki J, *et al.* Hepatic gene expression in hepatocyte-specific pten deficient mice showing steatohepatitis without ethanol challenge. *Hepatol Res* 2006; 34(4): 256-265.

285. Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem* 1998; 273(10): 5678-5684.

286. Cook WS, Jain S, Jia Y, Cao WQ, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS. Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha-responsive genes induced in the newborn but not prenatal liver of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase null mice. *Exp Cell Res* 2001; 268(1): 70-76.

287. Martínez-Chantar ML, Corrales FJ, Martínez-Cruz LA, García-Trevijano ER, Huang ZZ, Chen L, Kanel G, *et al.* Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J* 2002; 16(10): 1292-1294.

288. **Anstee QM, Goldin RD.** Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87(1): 1-16.

289. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105(8): 1067-1075.

290. Larter CZ, Yeh MM, Williams J, Bell-Anderson KS, Farrell GC. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol* 2008; 49(3): 407-416.

291. **Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM.** Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* 2008; 49(5): 1068-1076.

292. Yamazaki Y, Kakizaki S, Takizawa D, Ichikawa T, Sato K, Takagi H, Mori M. Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(2): 276-282.

293. **Spruss A, Bergheim I.** Dietary fructose and intestinal barrier: Potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 2009; 20(9): 657-662.

294. Bergheim I, Weber S, Vos M, Kramer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. *J Hepatol* 2008; 48(6): 983-992.

295. Kanuri G, Spruss A, Wagnerberger S, Bischoff SC, Bergheim I. Role of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *J Nutr Biochem* 2011; 22(6): 527-534.

296. Charlton M, Krishnan A, Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico A, Masuoko H, et al. Fast food diet mouse: Novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301(5): G825-34.

297. Tsuchiya H, Ebata Y, Sakabe T, Hama S, Kogure K, Shiota G. High-fat, high-fructose diet induces hepatic iron overload via a hepcidin-independent mechanism prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance in mice. *Metabolism* 2013; 62(1): 62-69.

298. Hashmi S, Wang Y, Parhar RS, Collison KS, Conca W, Al-Mohanna F, Gaugler R. A C. elegans model to study human metabolic regulation. *Nutr Metab (Lond)* 2013; 10(1): 31-7075-10-31.

299. Lee L, Alloosh M, Saxena R, Van Alstine W, Watkins BA, Klaunig JE, Sturek M, et al. Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the ossabaw miniature swine. *Hepatology* 2009; 50(1): 56-67.

300. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 19-34.

301. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(14): 1818-1892.

302. Maras JE, Talegawkar SA, Qiao N, Lyle B, Ferrucci L, Tucker KL. Flavonoid intakes in the baltimore longitudinal study of aging. *J Food Compost Anal* 2011; 24(8): 1103-1109.

303. Hollman PC, Bijsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res* 1999; 31(6): 569-573.

304. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(1 Suppl): 243S-255S.

305. Hakkinen SH, Karenlampi SO, Heinonen IM, Mykkanen HM, Torronen AR. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 1999; 47(6): 2274-2279.

306. Wiczkowski W, Romaszko J, Bucinski A, Szawara-Nowak D, Honke J, Zielinski H, Piskula MK. Quercetin from shallots (allium cepa L. var. aggregatum) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr* 2008; 138(5): 885-888.

307. **Nemeth K, Piskula MK.** Food content, processing, absorption and metabolism of onion flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2007; 47(4): 397-409.

308. **Scholz S, Williamson G.** Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *Int J Vitam Nutr Res* 2007; 77(3): 224-235.

309. Walle T, Otake Y, Walle UK, Wilson FA. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J Nutr* 2000; 130(11): 2658-2661.

310. **Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR.** Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocininduced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61(10): 1365-1374.

311. Hwang IK, Lee CH, Yoo KY, Choi JH, Park OK, Lim SS, Kang IJ, *et al.* Neuroprotective effects of onion extract and quercetin against ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *J Med Food* 2009; 12(5): 990-995.

312. Park HK, Kim SJ, Kwon do Y, Park JH, Kim YC. Protective effect of quercetin against paraquat-induced lung injury in rats. *Life Sci* 2010; 87(5-6): 181-186.

313. Choi EJ, Lee BH, Lee K, Chee KM. Long-term combined administration of quercetin and daidzein inhibits quercetin-induced suppression of glutathione antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol* 2005; 43(5): 793-798.

314. Shanely RA, Knab AM, Nieman DC, Jin F, McAnulty SR, Landram MJ. Quercetin supplementation does not alter antioxidant status in humans. *Free Radic Res* 2010; 44(2): 224-231.

315. **McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Quindry JC, Hosick PA, Hudson MH, Still L, et al.** Chronic quercetin ingestion and exercise-induced oxidative damage and inflammation. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; 33(2): 254-262.

316. Kawai M, Hirano T, Arimitsu J, Higa S, Kuwahara Y, Hagihara K, Shima Y, *et al.* Effect of enzymatically modified isoquercitrin, a flavonoid, on symptoms of japanese cedar pollinosis: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149(4): 359-368.

317. Joskova M, Franova S, Sadlonova V. Acute bronchodilator effect of quercetin in experimental allergic asthma. *Bratisl Lek Listy* 2011; 112(1): 9-12.

318. Han JJ, Hao J, Kim CH, Hong JS, Ahn HY, Lee YS. Quercetin prevents cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats. *J Vet Med Sci* 2009; 71(6): 737-743.

319. **Hubbard GP, Wolffram S, Lovegrove JA, Gibbins JM.** Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost* 2004; 2(12): 2138-2145.

320. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* 2009; 61(1): 67-75.

321. Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, Kurbitz C, Settler U, Plachta-Danielzik S, Wagner AE, *et al.* Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: A double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr* 2009; 102(7): 1065-1074.

322. Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(4): 1018-1025.

323. **Filho AW, Filho VC, Olinger L, de Souza MM.** Quercetin: Further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch Pharm Res* 2008; 31(6): 713-721.

324. Chuang CC, Martinez K, Xie G, Kennedy A, Bumrungpert A, Overman A, Jia W, et al. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor-{alpha}-mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr* 2010; 92(6): 1511-1521.

325. Lee KH, Park E, Lee HJ, Kim MO, Cha YJ, Kim JM, Lee H, *et al.* Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutr Res Pract* 2011; 5(1): 28-33.

326. Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Takahashi Y. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53(7): 859-868.

327. Youl E, Bardy G, Magous R, Cros G, Sejalon F, Virsolvy A, Richard S, *et al.* Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic beta-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *Br J Pharmacol* 2010; 161(4): 799-814.

328. Juzwiak S, Wojcicki J, Mokrzycki K, Marchlewicz M, Bialecka M, Wenda-Rozewicka L, Gawronska-Szklarz B, *et al.* Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacol Rep* 2005; 57(5): 604-609.

329. Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Ubgade A, Quazi M, Umathe S, Mundhada D. Reversal by quercetin of corticotrophin releasing factor induced anxiety- and depression-like effect in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34(6): 955-960.

330. Borska S, Drag-Zalesinska M, Wysocka T, Sopel M, Dumanska M, Zabel M, Dziegiel P. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of quercetin on human pancreatic carcinoma cell lines EPP85-181P and EPP85-181RDB. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48(2): 222-229.

331. Caltagirone S, Ranelletti FO, Rinelli A, Maggiano N, Colasante A, Musiani P, Aiello FB, *et al.* Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17(1): 51-59. 332. Warren CA, Paulhill KJ, Davidson LA, Lupton JR, Taddeo SS, Hong MY, Carroll RJ, *et al.* Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr* 2009; 139(1): 101-105.

333. Kaul TN, Middleton E,Jr, Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J Med Virol* 1985; 15(1): 71-79.

334. Li M, Xu Z. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Arch Pharm Res* 2008; 31(5): 640-644.

335. Wang YH, Chao PD, Hsiu SL, Wen KC, Hou YC. Lethal quercetin-digoxin interaction in pigs. *Life Sci* 2004; 74(10): 1191-1197.

336. **Choi JS, Piao YJ, Kang KW.** Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: Role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch Pharm Res* 2011; 34(4): 607-613.

337. Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Paschal DM, Apodaca MC, Liu Y, Sloan DD, *et al.* Silymarin inhibits in vitro T-cell proliferation and cytokine production in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; 138(2): 671-81, 681.e1-2.

338. Wagoner J, Morishima C, Graf TN, Oberlies NH, Teissier E, Pecheur EI, Tavis JE, *et al.* Differential in vitro effects of intravenous versus oral formulations of silibinin on the HCV life cycle and inflammation. *PLoS One* 2011; 6(1): e16464.

339. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. Inhibition of HCV 3a core gene through silymarin and its fractions. *Virol J* 2011; 8: 153-422X-8-153.

340. Chen C, Qiu H, Gong J, Liu Q, Xiao H, Chen XW, Sun BL, *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits the replication cycle of hepatitis C virus. *Arch Virol* 2012; 157(7): 1301-1312.

341. **Zuo G, Li Z, Chen L, Xu X.** Activity of compounds from chinese herbal medicine rhodiola kirilowii (regel) maxim against HCV NS3 serine protease. *Antiviral Res* 2007; 76(1): 86-92.

342. Roh C, Jo SK. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits hepatitis C virus (HCV) viral protein NS5B. *Talanta* 2011; 85(5): 2639-2642.

343. Haid S, Novodomska A, Gentzsch J, Grethe C, Geuenich S, Bankwitz D, Chhatwal P, *et al.* A plant-derived flavonoid inhibits entry of all HCV genotypes into human hepatocytes. *Gastroenterology* 2012; 143(1): 213-22.e5.

344. **Manvar D, Mishra M, Kumar S, Pandey VN.** Identification and evaluation of anti hepatitis C virus phytochemicals from eclipta alba. *J Ethnopharmacol* 2012; 144(3): 545-554.

345. **Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK.** Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm* 2007; 330(1-2): 155-163.

346. Kim K, Kim KH, Kim HY, Cho HK, Sakamoto N, Cheong J. Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the akt-SREBP-1 pathway. *FEBS Lett* 2010; 584(4): 707-712.

347. Jung JY, Lim Y, Moon MS, Kim JY, Kwon O. Onion peel extracts ameliorate hyperglycemia and insulin resistance in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8(1): 18-7075-8-18.

348. **Gnoni GV, Paglialonga G, Siculella L.** Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. *Eur J Clin Invest* 2009; 39(9): 761-768.

349. Shetty SN, Mengi S, Vaidya R, Vaidya AD. A study of standardized extracts of picrorhiza kurroa royle ex benth in experimental nonalcoholic fatty liver disease. *J Ayurveda Integr Med* 2010; 1(3): 203-210.

350. Loguercio C, Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, de Sio I, Di Leva A, Niosi M, *et al.* The effect of a silybin-vitamin e-phospholipid complex on nonalcoholic fatty liver disease: A pilot study. *Dig Dis Sci* 2007; 52(9): 2387-2395.

351. **Zeng CH, Zeng P, Deng YH, Shen N, Peng ML, Liu Q, Ren H.** The effects of curcumin derivative on experimental steatohepatitis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2011; 19(6): 454-459.

352. Shin SK, Ha TY, McGregor RA, Choi MS. Long-term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(12): 1829-1840.

353. **Denizot F, Lang R.** Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89(2): 271-277.

354. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-159.

355. **Förster VT.** Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annals of Physics, Leipzig* 1948; 2: 55-75.

356. Lakowicz JR. Energy transfer. in: Principles of fluorescence spectroscopy. *New York: Plenum Press* 1983; : 303-339.

357. **Spencer VA, Sun JM, Li L, Davie JR.** Chromatin immunoprecipitation: A tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 2003; 31(1): 67-75.

358. Weinmann AS, Farnham PJ. Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods* 2002; 26(1): 37-47.

359. **Benet M, Lahoz A, Guzmán C, Castell JV, Jover R.** CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) synergistically cooperate with constitutive androstane receptor to transactivate the human cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) gene: Application to the development of a metabolically competent human hepatic cell model. *J Biol Chem* 2010; 285(37): 28457-28471.

360. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

361. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685.

362. **Negro F, Sanyal AJ.** Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: Clinical and pathogenic data. *Liver Int* 2009; 29 Suppl 2: 26-37.

363. González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S. Hepatitis C virus, oxidative stress and steatosis: Current status and perspectives. *Curr Mol Med* 2011; 11(5): 373-390.

364. Negro F. Hepatitis C virus-induced steatosis: An overview. *Dig Dis* 2010; 28(1): 294-299.

365. Lima-Cabello E, García-Mediavilla MV, Miquilena-Colina ME, Vargas-Castrillón J, Lozano-Rodríguez T, Fernández-Bermejo M, Olcoz JL, *et al.* Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *Clin Sci (Lond)* 2011; 120(6): 239-250.

366. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T, Okazaki H, *et al.* Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol* 2001; 21(9): 2991-3000.

367. Kim TH, Kim H, Park JM, Im SS, Bae JS, Kim MY, Yoon HG, *et al.* Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferatoractivated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *J Biol Chem* 2009; 284(22): 15071-15083.

368. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 1995; 9(9): 1033-1045.

369. Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002; 277(13): 11019-11025.

370. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67: 491-498.

371. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, *et al.* Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(5): 1661-1666.

372. Kim K, Kim KH, Kim HH, Cheong J. Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXRalpha. *Biochem J* 2008; 416(2): 219-230.

373. **Na TY, Shin YK, Roh KJ, Kang SA, Hong I, Oh SJ, Seong JK, et al.** Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein-induced lipogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49(4): 1122-1131.

374. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, *et al.* Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(4): 1200-1205.

375. **Shi ST, Polyak SJ, Tu H, Taylor DR, Gretch DR, Lai MM.** Hepatitis C virus NS5A colocalizes with the core protein on lipid droplets and interacts with apolipoproteins. *Virology* 2002; 292(2): 198-210.

376. Jackel-Cram C, Qiao L, Xiang Z, Brownlie R, Zhou Y, Babiuk L, Liu Q. Hepatitis C virus genotype-3a core protein enhances sterol regulatory element-binding protein-1 activity through the phosphoinositide 3-kinase-akt-2 pathway. *J Gen Virol* 2010; 91(Pt 6): 1388-1395.

377. He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, Jacobs BL, *et al.* Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 2002; 76(18): 9207-9217.

378. **Huwait EA, Greenow KR, Singh NN, Ramji DP.** A novel role for c-jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase in the liver X receptor-mediated induction of macrophage gene expression. *Cell Signal* 2011; 23(3): 542-549.

379. **Kapadia SB, Chisari FV.** Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(7): 2561-2566.

380. **Ryan MC, Desmond PV, Slavin JL, Congiu M.** Expression of genes involved in lipogenesis is not increased in patients with HCV genotype 3 in human liver. *J Viral Hepat* 2011; 18(1): 53-60.

381. **Syed GH, Amako Y, Siddiqui A.** Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21(1): 33-40.

382. **Tsubota A, Fujise K, Namiki Y, Tada N.** Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2011; 17(4): 419-432.

383. Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, Owen DM, *et al.* Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology* 2010; 51(6): 1912-1921.

384. **Feld JJ, Hoofnagle JH.** Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 2005; 436(7053): 967-972.

385. Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007; 282(28): 20059-20063.

386. **Tai ZF, Zhang GL, Wang F.** Identification of small molecule activators of the janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway using a cell-based screen. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(1): 65-71.

387. Khachatoorian R, Arumugaswami V, Ruchala P, Raychaudhuri S, Maloney EM, Miao E, Dasgupta A, *et al.* A cell-permeable hairpin peptide inhibits hepatitis C viral nonstructural protein 5A-mediated translation and virus production. *Hepatology* 2012; 55(6): 1662-1672.

388. **Choi J, Ou JH.** Mechanisms of liver injury. III. oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(5): G847-51.

389. **Higueras V, Raya A, Rodrigo JM, Serra MA, Roma J, Romero FJ.** Interferon decreases serum lipid peroxidation products of hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(1): 131-133.

390. Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: Possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998; 25(9): 993-997.

391. Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, *et al.* Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int* 2008; 28(8): 1158-1166.

392. Vidali M, Tripodi MF, Ivaldi A, Zampino R, Occhino G, Restivo L, Sutti S, *et al.* Interplay between oxidative stress and hepatic steatosis in the progression of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008; 48(3): 399-406.

393. **Syed GH, Siddiqui A.** Effects of hypolipidemic agent nordihydroguaiaretic acid on lipid droplets and hepatitis C virus. *Hepatology* 2011; 54(6): 1936-1946.

394. **Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV.** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 2005; 280(7): 5636-5645.

395. Odbayar TO, Badamhand D, Kimura T, Takashi Y, Tsushida T, Ide T. Comparative studies of some phenolic compounds (quercetin, rutin, and ferulic acid) affecting hepatic fatty acid synthesis in mice. *J Agric Food Chem* 2006; 54(21): 8261-8265.

396. Jung CH, Cho I, Ahn J, Jeon TI, Ha TY. Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. *Phytother Res* 2013; 27(1): 139-143.

397. Harris C, Herker E, Farese RV, Jr, Ott M. Hepatitis C virus core protein decreases lipid droplet turnover: A mechanism for core-induced steatosis. *J Biol Chem* 2011; 286(49): 42615-42625.

398. **Neuschwander-Tetri BA.** Nontriglyceride hepatic lipotoxicity: The new paradigm for the pathogenesis of NASH. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12(1): 49-56.

399. **Toyoda M, Kitaoka A, Machida K, Nishinakagawa T, Yada R, Kohjima M, Kato M, et al.** Association between lipid accumulation and the cannabinoid system in Huh7 cells expressing HCV genes. *Int J Mol Med* 2011; 27(5): 619-624.

400. Konrad T, Zeuzem S, Vicini P, Toffolo G, Briem D, Lormann J, Herrmann G, *et al.* Evaluation of factors controlling glucose tolerance in patients with HCV infection before and after 4 months therapy with interferon-alpha. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(2): 111-121.

401. Kaul D, Sikand K, Shukla AR. Effect of green tea polyphenols on the genes with atherosclerotic potential. *Phytother Res* 2004; 18(2): 177-179.

402. **Moon HS, Chung CS, Lee HG, Kim TG, Choi YJ, Cho CS.** Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15(11): 2571-2582.

403. Lee J, Jung E, Lee J, Kim S, Huh S, Kim Y, Kim Y, *et al.* Isorhamnetin represses adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Obesity (Silver Spring)* 2009; 17(2): 226-232.

404. Imai Y, Yoshimori M, Fukuda K, Yamagishi H, Ueda Y. The PI3K/Akt inhibitor LY294002 reverses BCRP-mediated drug resistance without affecting BCRP translocation. *Oncol Rep* 2012; 27(6): 1703-1709.

405. **Milenkovic D, Deval C, Gouranton E, Landrier JF, Scalbert A, Morand C, Mazur A.** Modulation of miRNA expression by dietary polyphenols in apoE deficient mice: A new mechanism of the action of polyphenols. *PLoS One* 2012; 7(1): e29837.

406. **Hwang MK, Song NR, Kang NJ, Lee KW, Lee HJ.** Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is required for tumor necrosis factor-alpha-induced upregulation of matrix metalloproteinase-9: Its direct inhibition by quercetin. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(7): 1592-1600.

407. **Natsume Y, Ito S, Satsu H, Shimizu M.** Protective effect of quercetin on ER stress caused by calcium dynamics dysregulation in intestinal epithelial cells. *Toxicology* 2009; 258(2-3): 164-175.

408. Kaur S, Uddin S, Platanias LC. The PI3' kinase pathway in interferon signaling. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25(12): 780-787.

409. **Mannova P, Beretta L.** Activation of the N-ras-PI3K-akt-mTOR pathway by hepatitis C virus: Control of cell survival and viral replication. *J Virol* 2005; 79(14): 8742-8749.

410. **Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimito M, Akiyama M, et al.** Interferon-alpha-induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-akt-independent pathway. *J Gastroenterol* 2009; 44(8): 856-863.