



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Del cicle biològic a noves estratègies vacunals pel virus de l'hepatitis A

Gemma Chavarria Miró

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

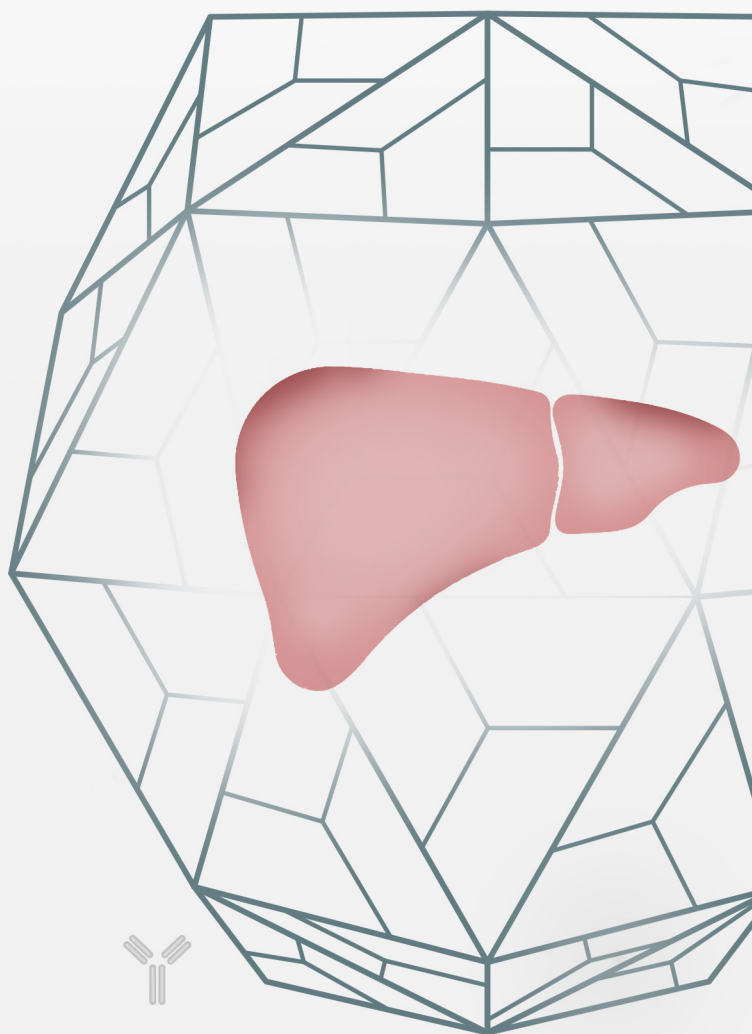
**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada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

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

# DEL CICLE BIOLÒGIC A NOVES ESTRATÈGIES VACUNALS PEL VIRUS DE L'HEPATITIS A

---

Tesi doctoral



**GEMMA CHAVARRIA MIRÓ**

Barcelona, 2023

---





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Programa de Doctorat Biotecnologia

Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística

Facultat de Biologia

# DEL CICLE BIOLÒGIC A NOVES ESTRATÈGIES VACUNALS PEL VIRUS DE L'HEPATITIS A

Memòria presentada per Gemma Chavarria Miró per optar al grau de Doctora per  
la Universitat de Barcelona

V. i P. de la directora i tutora

V. i P. del director

Rosa M. Pintó Solé

Maria Isabel Costafreda Salvany

La doctoranda

Gemma Chavarria Miró

Barcelona, Juliol 2023



**“The history of research into extracellular vesicles is an example of how a single term can delay the development of an entire scientific field”**

Edit I. Buzas

La present tesis ha estat finançada a través del projecte 201828 de la Fundació La Marató de TV3 i del projecte BIO2017-83191-R del Ministerio de Economía y Competitividad de España.

## AGRAÏMENTS

Ara sí que toca escriure les últimes línies d'aquesta tesis. Arribat aquest moment se'm fa difícil pensar que es tanca una de les etapes més importants de la meua vida, on tot i el gran esforç i sacrifici realitzats, ha sigut una etapa que recordaré sempre com una etapa en la que he sigut tremendament feliç. Qui em coneix, sap que soc una persona alegre i extrovertida, però que em costa expressar els meus sentiments. Utilitzaré aquest apartat per donar les gràcies a cadascuna de les persones que han estat al meu costat i han fet que aquesta tesis surti endavant. Després de tot aquest temps, he coincidit amb moltes persones i m'agradaria que d'alguna manera apareguessin en les properes línies.

Primer de tot, voldria donar les gràcies a les meves directores de tesi, **Rosa** i **Mari**, per confiar en mi des del primer moment i donar-me l'oportunitat de realitzar la tesis en el grup. **Rosa**, t'estaré eternament agraïda per la confiança, paciència i sobretot, per ensenyar-me el què és realment la ciència. Tu més que ningú sap totes les hores que hi ha darrere d'aquesta tesis. Gràcies per guiar-me en aquest camí. **Mari**, gràcies per tots els consells donats al llarg d'aquest temps, per estar disponible i disposada a ajudar en tot moment. També, gràcies per escoltar-me i fer-me tirar endavant quan ni jo mateixa sabia si podria. En segon lloc, voldria agrair tot el suport i l'ajuda donats per part de la **Susana** i sobretot, per contactar-me i oferir-me la possibilitat de realitzar el doctorat en el grup. Per últim, i no menys important, voldria donar les gràcies a l'**Albert**, qui sempre, tot i estar involucrat en milers de projectes, m'ha donat suport i ha confiat en mi. Agrair-te també tots els esforços que fas per mantenir al grup unit i amb nous reptes per poder seguir fent el que més ens agrada, ciència. A tots quatre, infinites gràcies.

A l'**Edu**, qui em va acollir en el grup com ningú. Sempre et donaré les gràcies per ser qui m'ha ajudat en tot moment. Fos quan fos, estaves allà per ajudar-me i escoltar-me. Hem viscut tants moments junts que és impossible mencionar-los tots, però sempre estaran en el record. Les corredisses pel passadís, els balls de la Nicki Minaj, els partits de pàdel, etc. Tots i cadascun d'ells han sigut moments inoblidables. No he pogut tenir al costat una altra persona per viure la tesis, sense tu no hauria sigut el mateix. Milions de gràcies.



A l'**Adán**, mi compi, trabajando codo con codo desde la carrera hasta el Doctorado. ¿Quién lo iba a decir? Las risas que nos hemos echado juntos han sido tremendas. Sigue siendo siempre ese personaje vayas donde vayas y alegrando a la gente con tus tonterías. Eres único. Gracias por compartir esta experiencia conmigo y nuestros ratoncitos. Te deseo lo mejor en tu recta final.

**Alba**, gràcies per tot el suport donat cada dia. Des del primer moment en que vas començar les pràctiques de grau has sigut exemplar. Què fàcil ha sigut ensenyar-te i que ràpid ho has agafat tot! Quina sort he tingut d'haver pogut compartir tantes hores de laboratori i dinars amb tu.

**David**, gràcies per ser el meu *beffi* del grup i per tot el que m'has ajudat. Gràcies per alegrar-me els dies al laboratori. Arribar i que et saludin cada dia amb un: "gemmeetaaa!", és començar sempre bé el dia. Pobre Albert, crec que deu estar bastant fart de nosaltres. Ets un crack! No canviïs mai. Gràcies per tant Deivid!!!

**Albert**, gràcies, gràcies i gràcies per la paciència i totes les hores dedicades a l'ordinador per mi. Sé que soc un desastre amb les tecnologies i per això hem inventat una nova unitat, anomenada "gemita". Podria esmentar moltes vivències al teu costat, com quan et dic guapo i t'enfades o quan et crido perquè alguna cosa no funciona: "Albert, Albeert, Albeeeeeert" o quan em sap greu si no vens a dinar o... un llarg etcètera. Sempre t'estaré molt agraïda per ser tan bon company.

**Cris, Albert** (Júnior), **Nerea**, gràcies a tots tres pels consells donats al llarg d'aquest temps i per les estones compartides.

També voldria donar les gràcies a tots els alumnes de pràctiques que han passat pel grup durant aquests anys, en especial a l'**Erika**, l'**Eve**, la **Lucie** i la **Lena**. Girls, you have made it very easy to teach and we have had many good moments together. I wish you the best.

**Ale, Manu** i **David**, el más madrugador del Departamento. Gràcies per compartir el laboratori 3 amb mi. Quina sort he tingut de tenir-vos com a companys. Gràcies per les xerrades, dinars i partits de pàdel junts. Ara que heu marxat, he pogut recuperar la taula que vaig perdre en un partit. Gràcies per tant amics!!!

Als de Vircont, **Cris, Martes, Sandra, Eva, Ayalke, Maria** i els **xiquets**, gràcies per tots els moments viscuts i per venir a veure'm al laboratori 1, on he estat molt soleta. Sé que veníeu expressament per mi i no per fer PCRs. Sou genials, no canviu! Ara tinc la sort que m'heu enviat a l'**Aiora** per fer-me companyia, a

qui agraeixo haver compartit amb mi els últims mesos de la tesis. Moltíssimes gràcies a tots als del grup, sou fantàstics! I tu també **Sílvia**!

A los del 4, **Andrés** y **Carlos** gracias por vuestra alegría y sacarme siempre una sonrisa. Andrés, muchas gracias por enseñarme a hacer Western Blots. Aún me queda enseñarte la Costa Brava para compensártelo.

També vull agrair a la resta de companys del Departament, **Robert, Geno, Sara, Pol, Maria, Gloria...** i una llarga llista, per tots els moments i dinars compartits aquests anys.

M'agradaria també fer constància del meu agraïment als companys de Farmàcia, en especial a la **Marga** i **Malén**, per ensenyar-me a manipular ratolins, tot i que alguna mossegada em vaig emportar. Gràcies pel suport constant en l'estabulari i fora d'ell. Aquesta tesis no hagués sigut possible sense vosaltres. També, als de l'IRTA-CReSA, **Fernando** i **Jordi**, per la dedicació en la immunització de porcs i els consells donats en tot moment. Al **Manel**, qui ha tingut la paciència d'ensenyar-me com funciona el microscopi confocal durant hores.

També voldria donar les gràcies a tots els meus amics de fora del Departament. Als de Manresa, **Raquel, Anna, Cris, Andrea, Roger...** i una llarga llista. Gràcies per estar-hi sempre! Sou uns amics genials. A les de la Uni, **Ari, Selene, Laura** i **Natàlia**, sou totes increïbles. Moltes gràcies per escoltar-me i donar-me suport. A la **Laia**, ets l'amiga que tothom voldria tenir. Gràcies de veritat!

Molt especialment, voldria donar les gràcies a tota la meva família. Als meus pares, sense ells mai hauria arribat a on soc ara. Moltes gràcies pares per sempre haver confiat en mi i ajudar-me a aconseguir tot allò que m'he proposat. No tinc suficients paraules per agrair-vos tot el que feu per mi. Als meus germans, **Albert** i **Marta**, sou els millors germans del món! Sense vosaltres tampoc hauria estat possible. Gràcies de debò per fer-me costat. Soc molt afortunada de tenir-vos. Als meus avis, per sempre creure en mi i sentir-se orgullosos de tenir una neta que serà doctora. Als meus sogres, **Paqui** y **Quico**, muchas gracias por vuestro cariño y apoyo constante.

A tu, **Enric**, qui més suport m'ha fet al llarg de la tesis. Gràcies per fer-me costat incondicionalment, per cuidar-me i per guiar-me sempre. Ets la millor persona amb qui podria compartir aquesta vida.

A tots vosaltres, gràcies.



## SINOPSIS

El virus de l'hepatitis A (HAV) s'allibera de cèl·lules infectades principalment embolcallat en membranes de la pròpia cèl·lula, formant partícules quasi embolcallades (eHAV). Es creu que la biogènesis d'eHAV podria utilitzar les vies pròpies que la cèl·lula utilitza per a la biogènesis dels exosomes cel·lulars. Les proteïnes RAB GTPases tenen un paper clau en l'alliberament d'exosomes mediat per syndecan-ALIX. En aquest treball, hem estudiat el patró d'expressió de diversos gens RAB que codifiquen proteïnes que poden estar implicades en l'alliberament d'exosomes a la línia cel·lular Huh7-AI derivada d'hepatòcits. El patró d'expressió gènic no ha diferit significativament entre els hepatòcits no polaritzats i els polaritzats, mostrant una expressió més alta de RAB11A, seguit de RAB35 i RAB7A. Per avaluar com la replicació viral afecta l'expressió gènica, s'han utilitzat dues soques d'HAV diferents en la seva capacitat de replicació: la soca HM175 (L0) i la de replicació ràpida HM175-HP (HP). Independentment de l'estat de polarització, l'expressió de RAB7A i RAB35 ha augmentat després de la infecció, sobretot amb HP. La microscòpia confocal ens ha permès identificar una co-localització clara entre les càpsides d'HP i RAB35. Al contrari, les càpsides L0 co-localitzen preferentment amb RAB7A. Aquests resultats suggereixen que s'utilitzen preferentment RAB35 i RAB7A per a la sortida d'eHAV a les cèl·lules infectades amb HP i L0, respectivament. En l'estudi amb cèl·lules polaritzades, RAB7A, RAB11A i RAB35 han co-localitzat amb marcadors tant de la membrana basolateral com apical i curiosament, RAB35 preferentment a la membrana basolateral. Amb els resultats obtinguts, la nostra hipòtesi planteja que RAB35 estaria implicat en la via de trànsit que es produeix a la membrana basolateral, la qual cosa ajudar a explicar l'alliberament més eficient de la població HP respecte la població L0 a través d'aquesta membrana. Per altra banda, tenint en compte la lenta replicació que presenten la majoria de soques d'HAV en diferents cultius cel·lulars i per tant, la baixa producció d'antigen necessari per una vacuna, el nostre objectiu és avaluar el potencial de la població HP com a candidata vacunal. El nostre estudi ha permès demostrar que la població HP mostra uns nivells de replicació més elevats i és més ràpida que la parental L0 en cèl·lules MRC-5, Vero i FRhK-4. Per tant, la població HP seria una bona candidata per produir una vacuna inactivada més barata i assequible. No obstant, un altre inconvenient present en la producció de vacunes és la falta d'adjuvants segurs i eficaços per immunopotenciar la resposta. Per

aquest motiu, s'ha estudiat la immunogenicitat de les partícules del virus nues (HAV) i les partícules del virus quasi-embolcallades (eHAV) en presència o absència d'adjuvant en dos models animals diferents, ratolins i porcs. Els resultats demostren que els quasi-embolcalls serien una bona estratègia per potenciar la resposta immune de ratolins i porcs. Concretament, la nostra proposta vacunal utilitzant la soca de replicació ràpida HP i les partícules quasi-embolcallades seria bona per implementar noves estratègies vacunals per l'HAV que abaratirien els costos de producció. A més, l'ús de l'adjuvant CAF01, juntament amb les partícules quasi-embolcallades, aporta resultats molt prometedors, on s'ha observat una resposta accentuada de Th1.





<b>ABREVIACIONS</b> .....	I
---------------------------	---

## **1. INTRODUCCIÓ**

1.1 Breu història de l'hepatitis A.....	3
1.2 El virus de l'hepatitis A.....	4
1.3 Composició i organització genòmica .....	5
1.4 Característiques i estructura de les partícules víriques .....	10
1.5 Cicle biològic.....	15
1.5.1 Entrada del virus a la cèl·lula .....	18
1.5.3 Sortida del virus de la cèl·lula .....	24
1.7 Manifestacions clíniques.....	30
1.8 Vies de transmissió .....	32
1.9 Incidència i vigilància epidemiològica .....	33
1.10 Importància sanitària i diagnòstic .....	35
1.11 Estratègies per al control i la prevenció de l'hepatitis A.....	37
1.11.1 Antivirals.....	39
1.11.2 Vacunes.....	40
1.12 Impacte de la introducció del programa universal de vacunació .....	42
1.13 Estudis i adaptació de l'HAV a cultiu cel·lular .....	45

## **2. OBJECTIUS**..... 51

### **3. CAPÍTOL 1. Estudiar el procés de sortida de l'HAV: paper de les proteïnes cel·lulars RAB**

3.1 Antecedents.....	55
3.2 Resultats .....	67
3.2.1 Expressió de diferents gens codificants de proteïnes RAB.....	67
3.2.2 Expressió de diferents gens codificants de proteïnes RAB en cèl·lules Huh7-AI infectades amb HAV.....	68
3.2.3 Colocalització de les proteïnes RAB i HAV en cèl·lules Huh7-AI no polaritzades .....	70



3.2.4 Silenciament dels gens RAB.....	73
3.2.5 Colocalització de les proteïnes RAB i HAV en cèl·lules Huh7-AI polaritzades.....	80
3.2.6 Sortida vectorial de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI polaritzades.....	83
3.2.7 Anàlisi d'alineament d'aminoàcids del fragment 130-137 de la proteïna VP2.....	87
3.2.8 Anàlisi d'alineament d'aminoàcids del fragment 119-126 de la proteïna VP1.....	89
3.2 Discussió.....	91
<b>4. CAPÍTOL 2. Avaluar el potencial de la població HM175-HP com a candidata vacunal</b>	
4.1 Antecedents.....	101
4.2 Resultats.....	104
4.2.1 Replicació del virus en tres línies cel·lulars: MRC-5, Vero i FRhK-4.....	104
4.2.2 Sortida del virus al sobrenedant de cèl·lules FRhK-4 infectades amb L0 i HP.....	106
4.3 Discussió.....	108
<b>5. CAPÍTOL 3. Caracteritzar les propietats immunogèniques en ratolins BALB/C i porcs Large White x Landrace de partícules d'HAV quasi-embolcallades comparades amb partícules nues de les poblacions HM175-HP (HP) i el seu ancestre HM175 (L0)</b>	
5.1 Antecedents.....	113
5.2.1 Caracterització antigènica de la població HP en comparació amb la població L0.....	118
5.2.2 Comparativa de la capacitat immunogènica de l'HAV en ratolins C57Bl/6 i BALB/C.....	120
5.2.3 Caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en ratolins BALB/C.....	122

5.2.4 Caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en porcs Landrace x Large White.....	144
5.2.5 Comparativa de la capacitat de neutralització de la infectivitat <i>in vitro</i> entre sèrums provinents de ratolins BALB/C i porcs Landrace x Large White.....	156
5.3 Discussió.....	158
<b>6. CONCLUSIONS</b>	
<b>7. MATERIALS I MÈTODES</b>	
7.1 Cèl·lules i virus.....	169
7.1.1 Línies cel·lulars .....	169
7.1.2 Recompte de la viabilitat cel·lular .....	172
7.1.3 Poblacions víriques .....	173
7.1.4 Obtenció de suspensions víriques de la soca parental HM175-L0 i la soca HM175-HP en cèl·lules FRhK-4.....	174
7.1.5 Producció de suspensions concentrades amb títols alts de partícules víriques en cèl·lules FRhK-4 .....	175
7.1.6 Replicació del virus parental HM175-L0 i del mutant HM175-HP en cèl·lules Huh7-AI .....	176
7.1.7 Quantificació del títol infeccions de les suspensions d'HAV: càlcul de la TCID <sub>50</sub> /ml .....	177
7.2 Quantificació mitjançant RT-qPCR de l'HAV.....	178
7.3 Quantificació relativa de l'expressió gènica en cèl·lules Huh7-AI .....	180
7.4 Microscòpia confocal.....	185
7.4.1 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per l'HAV i les proteïnes RAB .....	185
7.4.2 Ús del software d'anàlisi.....	187
7.5 Silenciament gènic de les proteïnes RAB7A, RAB11A i RAB35 .....	190
7.6 Polarització de cèl·lules Huh7-AI <i>in vitro</i> .....	192

7.6.1 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per cèl·lules Huh7-AI polaritzades.....	192
7.6.2 Infecció de monocapes polaritzades de cèl·lules Huh7-AI en transwells .....	194
7.7 Alineament de seqüències mitjançant el programa Mega.....	195
7.8 ELISA sandvitx indirecta per a la caracterització antigènica de càpsides de les poblacions LO i HP.....	196
7.9 Inoculació subcutània d'immunògens en ratolins BALB/C.....	198
7.10 Caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en ratolins BALB/C.....	200
7.10.1 ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV IgG totals .....	201
7.10.2 ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos específic anti-HAV IgG1 i IgG2a.....	203
7.10.3 Tècnica de neutralització de la infectivitat <i>in vitro</i> per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV neutralitzants.....	205
7.11 Inoculació subcutània d'immunògens en porcs Landrace x Large White.....	206
7.12 Caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en porcs Landrace x Large White.....	208
7.12.1 ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV IgG totals .....	208
7.12.2 ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos específic anti-HAV IgG1 i IgG2a.....	210
7.12.3 Tècnica de neutralització de la infectivitat <i>in vitro</i> per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV neutralitzants.....	212
7.13 Anàlisi estadístic.....	213
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>213</b>

## ABREVIACIONS

3D <sup>pol</sup>	Polimerasa 3D
AGMK	Cèl·lules de ronyó de mono verd africà
ALIX	<i>ALG-2-interacting protein X</i>
AMD	Actinomicina D
AP	Apical
ARE	<i>Apical recycling endosome</i>
ASGPR	Receptor hepatocel·lular asialoglicoproteïc
BL	Basolateral
CaCo-2	Cèl·lules de carcinoma de còlon humà
CPE	Efecte citopàtic
cre	Element cis-regulador
eHAV	Partícules de l'HAV quasi-embolcallades
eIF4G	Factor d'iniciació eucariota 4 gamma
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
FBS	Sèrum fetal boví
FBSi	Sèrum fetal boví inactivat
FRhK-4-6	Cèl·lules contínues de ronyó fetal de mico Rhesus
HAV	Virus de l'hepatitis A
HAVcr-1	Receptor cel·lular 1 de l'HAV
HepG2	Cèl·lules contínues de carcinoma de fetge humà
huHAVcr-1	Receptor cel·lular humà 1 de l'HAV
Huh7	Cèl·lules contínues de carcinoma de fetge humà
Huh7-AI	Cèl·lules derivades de les Huh7 adaptades a l'HAV

IgA	Immunoglobulina A
IgG	Immunoglobulina G
IgM	Immunoglobulina M
ILV	Vesícules intraluminals
IFN	Interferó
IRES	Lloc intern d'entrada del ribosoma
MAB	Anticòs monoclonal
MEM	Medi essencial mínim
MOI	Multiplicitat d'infecció
MRC-5	Cèl·lules diploides humanes derivades de fibroblasts de teixit pulmonar
MSM	<i>Men having sex with men</i>
mRNA	RNA missatger
MVB	Cossos multivesiculars
NCR	Regió no codificant
NEAA	Aminoàcids no essencials
OMS	Organització Mundial de la Salut
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PtdSer	Fosfatidilserina
RNA	Àcid ribonucleic
RT	Retrotranscripció
RT-qPCR	PCR a temps real
SAC	Compartiment de l'endosoma subapical
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TCID <sub>50</sub>	Dosi que provoca efecte citopàtic en el 50% de les monocapes cel·lulars

TIM1	<i>T cell immunoglobulin and Mucin1</i>
tRNA	RNA de transferència
TSG101	Tumor susceptibility gene 101 protein
UV	Ultravioleta



# **1. INTRODUCCIÓ**





## 1.1 Breu història de l'hepatitis A

L'hepatitis A és una malaltia que ha preocupat a la humanitat des de que els humans van començar a viure en grups prou grans com per mantenir la transmissió de l'agent infeccios. Les primeres referències registrades d'icterícia epidèmica, el que avui es coneix com a hepatitis A, daten de l'època d'Hipòcrates (segle V aC), tal i com menciona a la seva descripció al "De internis affectionibus". Segons detalla, la icterícia epidèmica a la regió mediterrània era ben coneguda en aquella època. Tot i així, no va ser fins molts segles després quan la primera evidència fiable d'icterícia epidèmica va ser descrita per Cleghorn a Menorca el 1745, però sense una caracterització satisfactòria de l'etiologia de la malaltia [1, 2].

El 1931 Findlay, Dunlop i Brown van atribuir l'etiologia de la icterícia epidèmica a un virus que només és patògen per a l'home [3]. No obstant, la naturalesa infecciosa de la malaltia es va identificar diversos anys més tard mitjançant estudis experimentals sobre infeccions humanes amb voluntaris durant la Segona Guerra Mundial. Aquests experiments van fer una clara distinció entre l'hepatitis infecciosa i la icterícia sèrica homòloga, entre les quals no hi havia immunitat creuada, ja que es podien transmetre a un mateix pacient. Això va demostrar que ambdós tipus d'hepatitis tenien una etiologia diferent [4]. El 1947 MacCallum va classificar aquestes dues formes d'hepatitis transmissible com a hepatitis A (hepatitis infecciosa) i hepatitis B (hepatitis sèrica) [5].

El virus causant va ser identificat gairebé 30 anys més tard per Feinstone i col·laboradors l'any 1973. Es van examinar mostres de femta de pacients infectats sota el microscopi electrònic i es van trobar petites partícules semblants a virus d'aproximadament 27 nm de diàmetre. Les troballes van

demostrar que aquestes partícules corresponien als virions del virus de l'hepatitis A (HAV) sense embolcall. Aquestes dades van accelerar el diagnòstic i els estudis de característiques generals del virus de l'hepatitis A [6]. Molts estudis han sigut realitzats utilitzant una soca australiana del virus de l'hepatitis A, HM175, que es va aïllar d'un brot que va tenir lloc a Melbourne, Austràlia, l'any 1976 [7]. Posteriorment, va ser adaptada a replicar en cultiu cel·lular i va ser àmpliament utilitzada per estudiar les propietats de l'estructura i l'estratègia replicativa del virus. Més recentment, s'ha aconseguit un fenotip atenuat del virus gràcies a una sèrie de canvis que resulten de replicar el virus en múltiples passatges en cultiu cel·lular [8], [9].

## 1.2 El virus de l'hepatitis A

El virus de l'hepatitis A inicialment s'havia classificat com a *Enterovirus 72* dins de la família *Picornaviridae* [10], però degut a les característiques que el diferenciaven de la resta de picornavirus posteriorment es va classificar dins d'un nou gènere, *Hepatovirus*, del qual n'és l'únic representant [11].

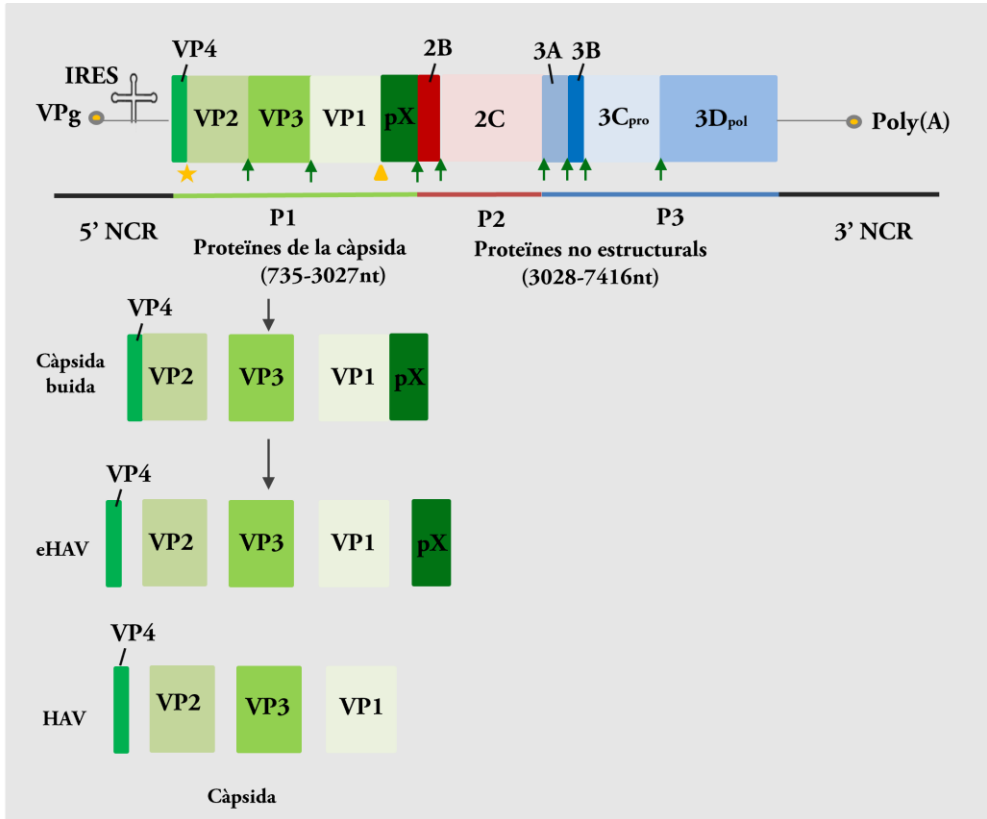
Fins fa poc, l'HAV s'havia considerat un virus no embolcallat, però recentment també s'ha descrit que el virus surt de la cèl·lula embolcallat en membranes de la pròpia cèl·lula, protegint els virions front a la neutralització per anticossos. Aquestes membranes no contenen glicoproteïnes codificades pel virus i per això se les anomena partícules quasi-embolcallades (eHAV) [12], [13]. Gràcies a aquest doble fenotip, per una banda, el virus en femta es troba en la forma nua que és més estable a pH baix, calor i dessecació, fent que el virus sigui més resistent a l'ambient. Per l'altra banda, en la sang dels individus infectats el virus es troba quasi-embolcallat aprofitant l'avantatge que li confereixen

aquestes membranes front als anticossos neutralitzants. D'aquesta manera aquest fenotip dual li facilita una millor propagació dins i entre els hostes [13].

### 1.3 Composició i organització genòmica

El genoma de l'HAV consisteix en un RNA monocatenari de polaritat positiva de 7,5 kb de longitud (**Figura 1**). A diferència d'altres virus de RNA, la família *Picornaviridae* no conté *cap* en el seu extrem 5', sinó que està lligat covalentment a una proteïna viral, VPg, codificada a la regió 3B. El RNA té una regió 5' no codificant (5'NCR), on s'hi troba el lloc d'entrada intern del ribosoma (IRES), seguit d'un únic marc de lectura obert (ORF) que codifica una poliproteïna d'uns 250 kDa i una regió 3' no codificant (3'NCR) amb una cua poli(A). L'IRES recluta les subunitats ribosomals per iniciar la traducció [14], [15], però la seva estructura en l'HAV és molt diferent a la dels altres membres de la família *Picornaviridae* i condueix a una traducció altament ineficient. De fet, difereix tant de la resta que és l'únic membre del grup III en la classificació d'IRES dels picornavirus [16], [17].

En la regió codificant s'identifiquen tres regions anomenades P1, P2 i P3. La primera conté la informació per produir les proteïnes de la càpsida, VP1, VP2, VP3 i VP4. P2 i P3 codifiquen per a proteïnes no estructurals que són essencials per a la síntesi de RNA i l'assemblatge del virus: 2B, 2C, 3A, 3B (també conegut com a VPg), 3Cpro (proteasa) i 3Dpol (RNA polimerasa RNA dependent) [18].



**Figura 1. Organització genòmica i processament proteolític de la poliproteïna de l'HAV.** El genoma de l'HAV consisteix en un RNA monocatenari de polaritat positiva que conté un únic marc obert de lectura i codifica per una única poliproteïna. Es mostra la regió 5' no codificant (5'NCR) que inclou l'IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), els tres segments principals (P1, P2 i P3) i la regió no codificant a 3' (3'NCR) que conté una cua de poli-A. El processament de la proteïna dona lloc a múltiples intermediaris de processament. La cinètica no es coneix amb detall, però sembla que la majoria dels esdeveniments d'escissió estan mediat per la proteasa 3C<sub>pro</sub>, a excepció de dos talls que estan mediat per dues proteases cel·lulars desconegudes. Una d'elles produeix el tall entre VP4 i VP2 (símbol estrella groga), la qual és activada per l'empaquetament del genoma; l'altra escindeix pX de la càpsida (símbol triangle groc) després de la pèrdua de la membrana del virió quasi-embolcallat (eHAV), donant com a resultat el virió nu (HAV). Imatge creada a partir de [15], [18], [19].

L'estudi de l'estructura cristal·logràfica de la proteïna 2B de l'HAV, va revelar un fragment N-terminal estructuralment molt similar al domini carboxi de la proteïna 2A d'*Enterovirus*. Canvis subtils en l'especificitat de la proteasa 3C d'un ancestre de l'HAV haurien donat lloc a l'abolició del tall entre 2A/2B i al seu desplaçament cap a l'extrem amino i conseqüentment, al truncament i pèrdua de funció de la proteasa 2A, quedant-se l'HAV sense aquesta proteasa per processar els factors de traducció eucariota 4G (eIF4G) i 4E (eIF4E), els quals són processats o degradats, respectivament, per altres picornavirus per tal d'induir el *shut-off* cel·lular. Per tant, aquesta pèrdua de la proteasa 2A inhabilitaria el virus per induir l'aturada de traducció cel·lular [20], [21]. En conseqüència, l'HAV ha de competir amb els mRNA cel·lulars per traduir el seu genoma. Per altra banda, aquest canvi en el lloc de tall de 2A/2B donaria lloc a un domini addicional a la proteïna 2B i alhora 2A quedaria unit a la proteïna VP1 i tindria una funció estructural.

Per intentar minimitzar els efectes d'aquesta situació de competència pels tRNAs i maquinària traduccional, l'HAV ha adoptat un ús de codons deoptimitzat respecte al de la cèl·lula hoste: usa com a codons freqüents aquells que són moderament utilitzats per la cèl·lula, i com a codons rars tant aquells que són rarament usats com els que són abundantment usats per la cèl·lula [22]. Els codons rars usats per la cèl·lula s'aparellen amb tRNAs que es troben a baixes concentracions en el pool de tRNAs. En canvi, els codons abundants de la cèl·lula s'aparellen amb tRNAs que es troben a altes concentracions, però donat que el virus no és capaç d'inhibir la síntesi proteica cel·lular aquests tRNAs no estaran a l'abast per la traducció del genoma víric. És a dir, l'ús de codons de l'HAV és en certa manera antagònic al de la cèl·lula, de manera que el virus mai utilitza com a freqüent un codó que la cèl·lula utilitza en alta freqüència sinó que sovint utilitza aquest últim com a rar (**Taula 1**). Concretament, el virus utilitza un total de 27 codons rars, els quals es troben repartits entre 15 aminoàcids. Aquesta

estratègia d'utilitzar amb més freqüència els codons que no fa servir gaire la cèl·lula pot ser un dels factors que contribueixen a la lenta replicació i baixa productivitat del virus i també, a la baixa variabilitat antigènica de l'HAV [22], [23].

S'ha demostrat que l'ús d'un codó o un altre per un determinat aminoàcid pot modificar la velocitat de traducció en funció de la seva abundància: els codons abundants són traduïts ràpidament donada l'alta concentració dels tRNAs homòlegs, mentre que els codons rars són traduïts lentament per la seva baixa concentració [24]. Així, l'acumulació de codons rars pot induir parades transitòries del complex traduccional mentre aquest busca el tRNA apropiat, el qual es troba en baixes concentracions. La funció d'aquestes pauses és assegurar el correcte plegament de la proteïna que se sintetitza [25]. De fet, el 15% dels residus presents a la superfície de la càpsida estan codificats per codons rars i es troben en regions altament conservades [26]. Per tant, sembla que les parades del complex traduccional degudes a l'ús de codons rars siguin les responsables de garantir el correcte plegament de les proteïnes estructurals de l'HAV [25].

**Taula 1. Ús de codons relatiu de l'HAV en comparació amb el de la cèl·lula humana.** Per cada aminoàcid el codó més abundant rep un valor de 100 i la resta de codons s'expressen com a percentatge d'aquest codó més abundant. En negreta es mostren els codons que l'HAV utilitza com a rars [16].

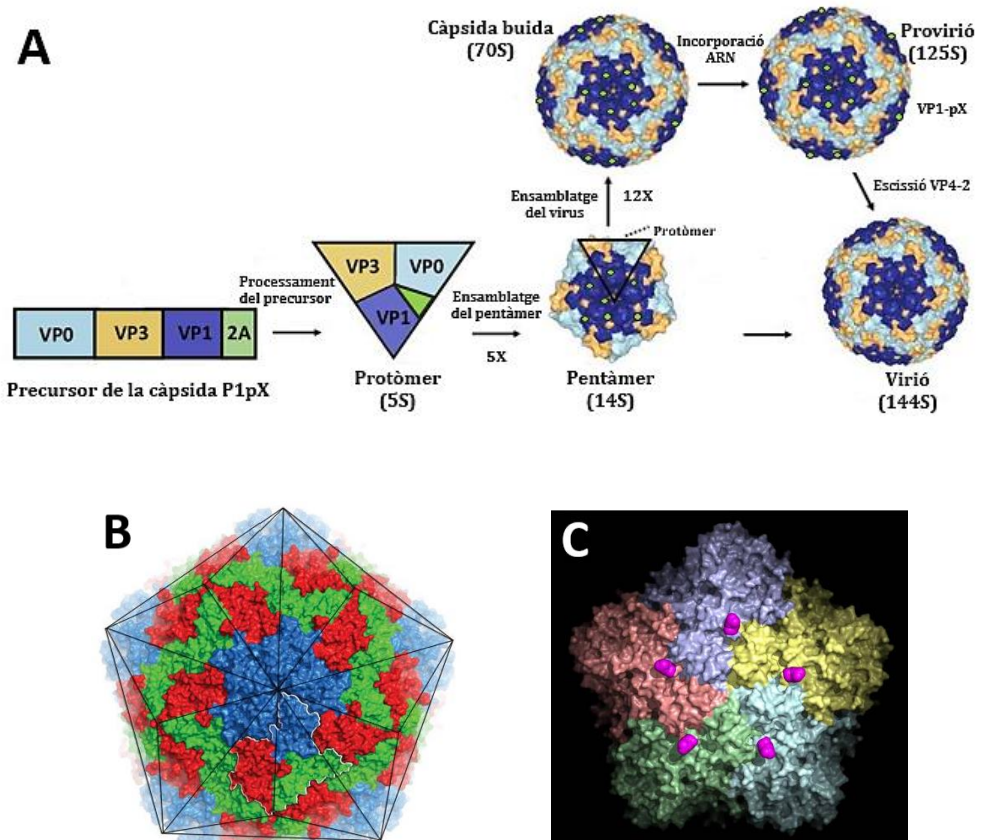
Aminoàcid	Codó	HAV	Cèl·lula humana
Arg	AGA	100	100
	<b>AGG</b>	29	99
	<b>CGC</b>	3	87
	<b>CGU</b>	3	38
	<b>CGA</b>	3	51
	<b>CGG</b>	1	95
Leu	UGG	100	32
	UUA	52	19
	CUU	46	33
	<b>CUG</b>	25	100
	<b>CUA</b>	9	17
	<b>CUC</b>	7	49
Ser	UCU	100	77
	UCA	84	62
	AGU	32	62
	<b>UCC</b>	28	91
	<b>UCG</b>	5	22
	<b>AGC</b>	5	100
Thr	ACU	100	69
	ACA	91	79
	<b>ACC</b>	18	100
	<b>ACG</b>	4	32
Pro	CCU	100	88
	CCA	89	85
	<b>CCC</b>	20	100
	<b>CCG</b>	2	35
Ala	GCU	100	66
	GCA	61	56
	<b>GCC</b>	30	100
	<b>GCG</b>	1	26
Gly	GGA	100	73
	GGU	58	48
	GGG	34	73
	<b>GGC</b>	28	100
Val	GUU	100	39
	GUG	46	100
	<b>GUA</b>	18	25
	<b>GUC</b>	13	52
Lys	AAA	100	76
	AAG	59	100
Asn	AAU	100	88
	<b>AAC</b>	19	100
Gln	CAG	100	100
	CAA	88	35
Hís	CAU	100	71
	<b>CAC</b>	22	100
Glu	GAA	100	72
	GAG	77	100
Asp	GAU	100	86
	<b>GAC</b>	19	100
Tyr	UAU	100	79
	<b>UAC</b>	26	100
Cys	UGU	100	83
	<b>UGC</b>	26	100
Phe	UUU	100	85
	<b>UUC</b>	27	100
Ile	AUU	100	76
	AUA	32	35
	<b>AUC</b>	16	100



## 1.4 Característiques i estructura de les partícules víriques

La càpsida madura sense embolcall d'uns 30 nm de diàmetre i de simetria icosaèdrica [27] està formada per 60 còpies de cadascuna de les proteïnes individuals de la càpsida VP1, VP2 i VP3 [28]. La unitat bàsica de la càpsida és el protòmer amb un coeficient de sedimentació de 5S (**Figura 2A**). La proteïna no processada P1pX es plega sobre si mateixa donant el protòmer. En aquest punt la proteïna és processada per la proteasa 3C donant lloc a cadascuna de les proteïnes de la càpsida VP4-VP2 (VP0), VP3 i VP1pX. El conjunt de 5 unitats d'un protòmer forma un pentàmer que té un coeficient de sedimentació de 14S. Posteriorment, l'associació de 12 pentàmers construeix la càpsida buida amb un coeficient de sedimentació de 70S. Finalment, la càpsida buida incorpora el RNA convertint-se en un virus infecciós amb un coeficient de sedimentació de 125S [29]. Aquesta partícula immadura entraria al MVB donant el virus quasi-embolcallat (veure detalls més endavant). L'escissió de VP4-VP2 produeix una partícula amb un coeficient de 144S, però no se sap ni quan ni on té lloc (**Figura 2B i C**). Aquest pas genera la proteïna de la càpsida VP2 madura i un fragment amino terminal més petit anomenat VP4 [27].

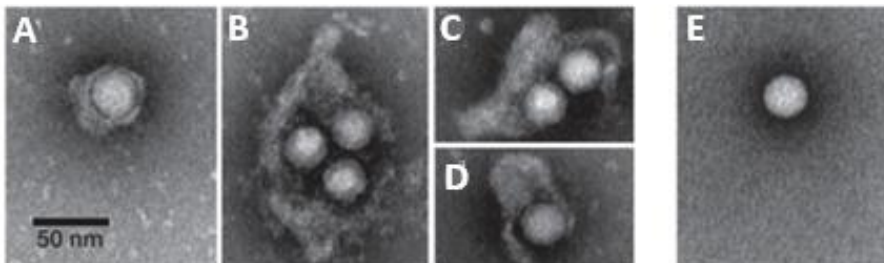
Els treballs recents de cristal·lografia de raigs X han demostrat que la càpsida madura de l'HAV és força diferent a la d'altres picornavirus, com el poliovirus o el virus de la febre aftosa. A més les partícules de l'HAV, són notablement més resistents a la temperatura i pH àcid en comparació amb els altres picornavirus [30]. La proteïna VP2 presenta un plec que envaeix el protòmer veí i podria explicar la cohesivitat de la càpsida. No obstant, aquest plec el presenten també els virus *picorna-like* primitius que infecten insectes i que no tenen càpsides especialment estables. Per tant, aquesta estabilitat hauria de venir determinada per altres característiques de les partícules de l'HAV.



**Figura 2. Estructura de la càpsida de l'HAV.** A) Formació de la càpsida vírica a partir d'un protòmer. Imatge adaptada de [31]. B) Superfície accessible de l'HAV (VP1, blau; VP2, verd; VP3, vermell). Els diferents costats de l'icosaedre estan representats per les línies negres. C) Il·lustració hipotètica d'un virió madur. La proteïna VP1 es produeix inicialment amb una extensió C-terminal de 8 kDa (coneguda com a pX o 2A) única a l'HAV. L'extensió pX és escindida de la partícula completa per una proteasa de l'hoste encara desconeguda. La imatge mostra la predicció de la posició de pX (en fúcsia), si estigués present en els virions madurs, a la superfície del virus. Imatges extretes de [30].

Recentment s'ha identificat diverses espècies d'*Hepatovirus* en teixits i excrements de ratpenats, musaranyes, eriçons, diferents rosegadors i foques [30], [32]–[34]. Les reconstruccions filogenètiques suggereixen que l'HAV podria originar d'un ancestre que infectava un petit mamífer insectívor [33].

Clàssicament, els virus s'han classificat com embolcallats o nus. No obstant això, estudis recents amb l'HAV, i també amb l'HEV, han revelat que tots dos virus tenen un doble fenotip (**Figura 3**). Per una banda, s'eliminen a les femtes dels individus infectats com virions nus, sense embolcall, els quals són més resistents a les condicions ambientals. I, per l'altra banda, circulen per la sang durant la infecció aguda com partícules quasi-embolcallades amb una membrana que els permet protegir-se front als anticossos neutralitzants de l'hoste tot i mantenint la infectivitat [13]. Aquestes dues formes de partícules, que en el cas de l'HAV denominarem HAV i eHAV, respectivament, mostren diferents densitats en gradients isopícnics d'iodixanol. Els virions nus (HAV) tenen una densitat d'aproximadament  $1,22 \text{ g/cm}^3$  amb uns 27 nm de diàmetre, mentre que els quasi-embolcallats (eHAV) tenen una densitat d'entre a  $1,08$  i  $1,1 \text{ g/cm}^3$  i una mida de 50-110nm. Les partícules quasi-embolcallades poden contenir més d'una càpsida i són semblants als exosomes, els quals són petites vesícules extracel·lulars amb un paper important en les comunicacions intercel·lulars [12]. A més, els virions continguts en les partícules quasi-embolcallades presenten una particularitat: la proteïna VP1 conserva l'extensió pX (anomenada també 2A) a l'extrem carboxil terminal (C-terminal) (**Figura 1 i 2C**). La proteïna pX té un paper important en l'ensamblatge de la càpsida, de la qual s'escindeix quan la partícula perd la membrana.



**Figura 3. Partícules del virus de l'HAV. A-D)** Forma quasi-embolcallada (eHAV). **E)** Forma nua (HAV). Imatges extretes de [12].

L'estructura antigènica de l'HAV s'ha caracteritzat gràcies a estudis de la resistència a la neutralització de mutants d'escapament a diferents anticossos monoclonals (mAbs) i també per estudis de *footprints* [35]. A partir d'aquests estudis s'ha determinat que l'HAV presenta poca variabilitat antigènica. De fet, s'ha descrit un únic serotip i uns pocs llocs antigènics. Existeixen tres epítops principals en l'estructura antigènica de la càpsida de l'HAV: el lloc immunodominant (lloc d'unió dels mAbs K24F2 i K34C8), el lloc d'unió de la glicoforina A (lloc d'unió del mAb H7C27) i l'epítop encara no definit (reconegut pel mAb 4E7). El lloc immunodominant, definit com a tal perquè s'hi uneixen la majoria d'anticossos, inclou residus de VP3 i VP1, dels quals els residus 65, 70, 71 i 74 de VP3 i els 102, 104, 105, 171, 176 i 232 de VP1 s'han identificat com a mutants d'escapament de neutralització [35], [36]. El lloc d'unió de la glicoforina A també pot presentar canvis en aminoàcids que van perdre una part o la totalitat del reconeixement per part dels mAbs. Aquests canvis al lloc d'unió de la glicoforina A es troben als residus 221 [35], 217 [37] i 114 de la VP1 [38], aquest últim mutant només presenta una resistència parcial de l'anticòs. Per l'epítop no definit no s'ha trobat cap mutant d'escapament i no es coneix la seva localització exacta [36], [39]. També, s'ha descrit un nou epítop continu a la proteïna VP3, diferent als mencionats anteriorment, utilitzant pèptids sintètics que representen parts de la seqüència primària de les proteïnes de la càpsida [40]. Més recentment, s'ha caracteritzat un anticòs monoclonal, R10, neutralitzant específic d'HAV, el qual s'uneix als residus 67 de la proteïna VP2 i 150 i 209 de la VP3. Aquesta regió del lloc d'unió del monoclonal R10 s'identifica també com l'àrea on s'uneix TIM-1, receptor cel·lular essencial per l'HAV, i, per tant, la neutralització es dona segurament per la prevenció de la unió del receptor TIM-1 amb l'HAV [41].

Tot i l'existència de variants antigèniques, aquestes substitucions afecten només epítops únics d'un lloc antigènic complex i es necessiten substitucions

més extenses per a l'aparició d'un nou serotip. Per aquest motiu només existeix un únic serotip d'HAV, sent aquesta una altra diferència notable amb altres membres de la família Picornaviridae. [26].

Aquesta manca de variabilitat antigènica és probable que vingui donada per les constriccions estructurals i biològiques de la càpsida [26], [37]. Aquestes constriccions estructurals, juntament amb l'ús altament deoptimitzat de codons respecte a la cèl·lula, pot afavorir aquest fenotip antigènicament estable [37]. Fent un anàlisi de les quasiespècies emergents de l'HAV sota la pressió de mAbs, s'ha observat que un percentatge molt elevat dels canvis d'aminoàcids detectats en VP1 i VP3 són transicions que mantenen la raresa dels nous codons respecte els inicials i que un percentatge molt més baix d'aquests canvis són transversions que també mantenen la freqüència de la raresa. En canvi, percentatges molt baixos d'aquests canvis són transicions i transversions que provoquen canvis en la freqüència dels codons. Aquests resultats revelen el predomini de les transicions sobre les transversions, com era d'esperar, i la importància de la freqüència de l'ús de codons. Això explica la poca coincidència entre els residus codificats per codons rars i aquells en els que es van detectar canvis durant l'adaptació a multiplicar en presència de mAbs. En altres paraules, els codons rars són altament conservats en les diferents soques d'HAV i la seva substitució és seleccionada negativament, inclús sota la pressió immune específica [23]. De fet, com ja s'ha comentat, el 15% dels residus de la càpsida codificats per codons rars estan exposats a la superfície i localitzats prop dels epítops. Per aquesta raó, aquesta selecció negativa previndria que emergissin variants antigèniques [26].

En varis estudis s'ha observat que tot i la baixa variabilitat antigènica, l'HAV té un grau significatiu de variabilitat de nucleòtids, similar a d'altres picornavirus. Estudis de la variabilitat de la regió VP1pX(2A), la qual és la regió

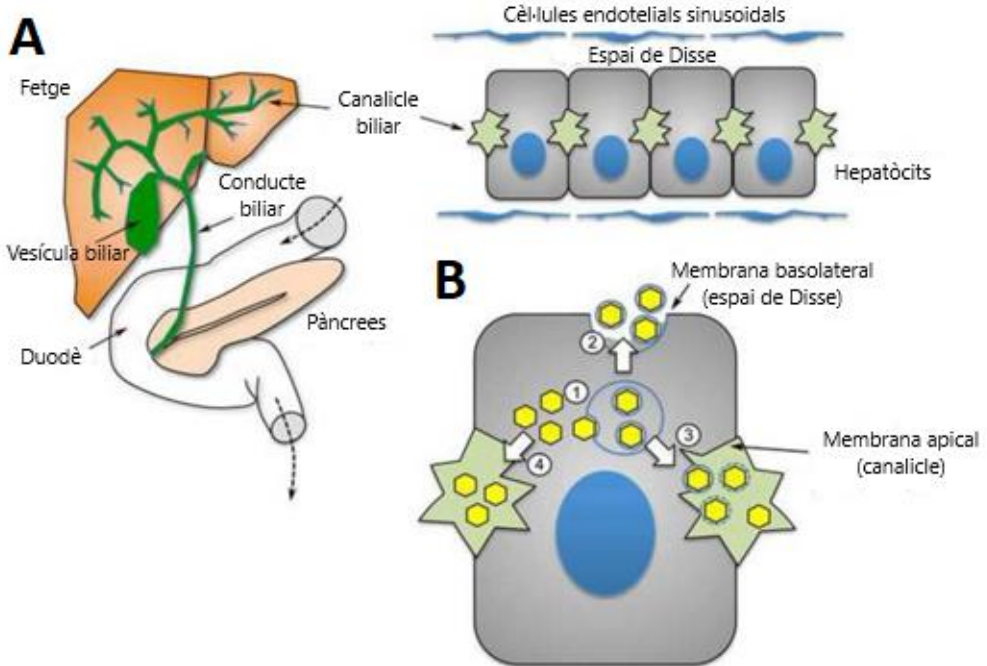
genòmica més utilitzada per estudis de diversitat genètica, han permès definir 6 genotips: tres d'aquests genotips (I, II i III) són d'origen humà i els altres (IV, V i VI) d'origen simi. Els genotips humans es divideixen en 7 subgenotips (IA, IB, IC, IIA, IIB, IIIA i IIIB), sent IA el més prevalent a tot el món [40], [42], [43].

## 1.5 Cicle biològic

El cicle biològic de l'HAV s'inicia normalment per la ingestió del virus nu. No està clar quins tipus cel·lulars s'infecten en primer lloc, però es creu que un cop a l'aparell digestiu, el virus probablement replicaria a nivell de mucosa estomacal o intestinal per amplificar l'inòcul. Seguidament, el virus passa a través de la mucosa de l'intestí prim per arribar al torrent sanguini, on produeix una fase de virèmia [44], [45]. Com el virus accedeix al torrent sanguini no està encara clar. Mitjançant estudis *in vitro* amb cèl·lules epitelials intestinals polaritzades s'ha suggerit que un cop replicat a l'intestí prim, el virus sortiria per la membrana apical sent excretat al lumen intestinal [46]. Per comprendre el pas del virus al torrent sanguini s'ha plantejat dos models. Seguint el model del poliovirus [47], l'HAV faria una transcitosi de l'intestí a la sang a través de les cèl·lules M, enteròcits especialitzats en la captació d'antígens a les plaques de Peyer. Un segon model planteja una transcitosi del virus associat a IgA a través de l'epiteli intestinal mitjançant el receptor polimèric d'immunoglobulines (pIgR). Aquest mecanisme té rellevància per la presència de complexos intestinals d'HAV-IgA durant la infecció aguda, els quals s'ha vist que són infecciosos en els hepatòcits, i poden protegir al virus de la neutralització per IgG en sang, perllongant la infecció [48]. No obstant, el descobriment de l'existència de la forma quasi-embolcallada de l'HAV (eHAV), ha fet replantejar ambdós models descrits amb anterioritat. Per tant, encara es necessiten més

estudis per determinar el mecanisme utilitzat pel virus per accedir de l'intestí al torrent sanguini.

Un cop el virus es troba en el torrent sanguini, a través de la circulació portal hepàtica arriba al seu òrgan diana, el fetge. S'ha suggerit que a través de la circulació portal, la forma nua de l'HAV probablement arriba a la membrana basolateral de l'hepatòcit a través de l'espai de Disse i infecta els hepatòcits per endocitosis mediada per IgA mitjançant el receptor d'asialoglicoproteïna hepatocel·lular específic d'IgA (ASGPR). Dins l'hepatòcit, l'HAV replica massivament [45]. El mecanisme que utilitza el virus per arribar al fetge també té moltes incògnites, però el model acceptat fins al moment es basa en l'existència d'un cicle enterohepàtic (**Figura 4A**). La progènie vírica és secretada per l'hepatòcit a través dels canalicles biliars cap a les vies biliars i novament a l'intestí. Des d'aquí, els virus poden ser excretats en la femta o bé reabsorbits i transportats de nou cap al fetge, el qual constitueix un cicle enterohepàtic. Aquest cicle continua fins que els anticossos neutralitzants o altres mecanismes l'interrompen. S'ha proposat que les reinfeccions del fetge es donen gràcies a la formació dels complexos HAV-IgA i es frenen quan grans quantitats d'IgG desplacen la IgA [48]. Per tant, en aquest model les reinfeccions dependrien de com es desenvolupa la resposta d'IgG contra HAV. La possible transcitosis duta a terme per IgA a nivell de l'epiteli intestinal i el fet que la IgA pugui ajudar a l'HAV a entrar als hepatòcits, ha portat a postular que aquest tipus d'immunoglobulina juga un paper clau com a transportador del virus en el seu cicle vital [49], [50].



**Figura 4. Cicle enterohepàtic de l'eHAV.** **A)** Hepatòcits polaritzats (dreta) on principalment es duu a terme la replicació de l'eHAV. El virus és alliberat a través de la membrana apical al canalicle biliar i arriba al duodè a través del conducte biliar, per després ser excretat en femta (esquerra). Menys freqüentment, el virus també pot sortir a través de la membrana basolateral cap a l'espai de Disse i arribar a la sang en forma quasi-embolcallada a través dels sinusoides hepàtics (dreta). **B)** Sortida de l'eHAV en hepatòcits. (1) Els eHAV (hexàgons grans) probablement es formen per la gemmació en cossos multivesiculars (MVB, de l'anglès) dirigida per la interacció de la càpsida amb ALIX i el sistema ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*), i (2) després s'alliberen a través de la membrana basolateral a l'espai de Disse donant lloc a un sistema de circulació d'eHAV sistèmic. Els virus alliberats en femta són nus, i podrien sortir dels hepatòcits per la membrana apical, ja sigui (3) per un mecanisme similar amb pèrdua de l'embolcall a causa de l'acció de les sals biliars o (4) per un mecanisme independent. Imatge adaptada de [51].

El descobriment de la forma quasi-embolcallada, tal i com s'ha mencionat, ha generat un canvi de paradigma sobretot en el cicle biològic del virus. S'ha descrit un nou model de cicle biològic on aquesta forma quasi-embolcallada hauria arribat a la sang sortint a través de la membrana basolateral de l'hepatòcit fins a l'espai de Disse, on es troben els sinusoides hepàtics (**Figura 4B**). De fet, s'ha observat que l'eHAV podria afavorir la persistència del virus en sang, ja que aquestes partícules no són neutralitzades pels anticossos específics



anti-HAV [12], [51], [52]. Segons aquest nou model, les partícules eHAV facilitarien la propagació de l'HAV entre els hepatòcits, ja que els virus haurien sortit fins a l'espai de Disse, on podrien després entrar als hepatòcits adjacents. Per altra banda, aquest model també explica que les partícules nues en femta podrien provenir de dues vies diferents, o bé de partícules eHAV que perdrien l'embolcall al sortir de la membrana apical degut a l'acció de les sals biliars o bé podrien sortir de l'hepatòcit com a partícules nues per la membrana apical utilitzant algun mecanisme independent [51]. La primera via és la que actualment s'accepta.

### 1.5.1 Entrada del virus a la cèl·lula

Fa més de 20 anys que s'havia descrit el receptor de fosfatidilserina (PtdSer) TIM1 (*T cell immunoglobulin and Mucin1*), també anomenat HAVcr1, com a receptor cel·lular essencial per l'HAV [53], [54]. Aquesta molècula és una glicoproteïna de transmembrana que fa possible l'entrada de l'HAV en cèl·lules de ronyó de mico (*African green monkey kidney cells, AGMK*) [54]. S'expressa en gran varietat de teixits i és per això que es creu que requeriria de coreceptors per l'entrada de l'HAV al fetge. Per exemple, la proteïna humana TIM-3 (*T cell immunoglobulin and Mucin1*), s'ha suggerit com a possible coreceptor ja que presenta una homologia significativa amb l'huHAVcr-1, l'homòleg humà d'HAVcr1[53]. Tot i així, no actuaria ell mateix com a receptor del virus [55]. TIM1 va ser descrit abans del descobriment de l'existència de les partícules quasi-embolcallades i des de llavors, el mecanisme d'entrada del virus està sent un tema de gran debat.

El fet que les dues partícules d'HAV siguin tan diferents dificulta explicar l'entrada viral a la cèl·lula [12]. Estudis recents *in vitro* amb cèl·lules Vero,

provinents de ronyó de mico i utilitzant les dues formes conegudes d'HAV, la nua (HAV) i la quasi-embolcallada (eHAV), mostren com TIM1 gràcies a la seva capacitat per interaccionar amb la PtdSer, present a la superfície del quasi-embolcall [56], facilita la unió de l'eHAV, però no de les HAV [57], tot i no ser essencial per cap de les dues formes en aquesta línia cel·lular. Aquesta observació condueix a especular que hi hauria un altre receptor per la forma nua. En canvi, estudis *in vitro* amb cèl·lules Huh7.5, les quals són cèl·lules hepàtiques humanes, mostren que TIM1 no semblaria facilitar l'adherència ni del virus quasi-embolcallat ni del nu, i per tant, tindria un paper poc rellevant. Aquesta diferència entre ambdós tipus cel·lulars podria ser explicada per l'alta expressió de TIM1 en cèl·lules de ronyó [53]. En simis i múrids s'ha vist que TIM1 no és essencial, tot i que semblaria que podria promoure la disseminació del virus al fetge [57]. Contràriament, altres estudis *in vitro* realitzats amb cèl·lules renals de mono verd africà (AGMK), el receptor TIM1 és el receptor principal tant per la forma quasi-embolcallada com per la nua, suggerint que ambdós tipus de partícules el farien servir per igual. En aquest mateix estudi, suggereixen que ambdues formes del virus utilitzarien el receptor TIM-1 per igual a les cèl·lules Vero. En canvi, en les cèl·lules Huh7-AI, TIM1 seria utilitzat només per l'eHAV i no per l'HAV, el qual utilitzaria un receptor addicional [58]. Per tant, tenint en compte tots els estudis *in vitro* realitzats fins al moment, encara està per identificar un receptor essencial o addicional al TIM1 per a l'entrada tant d'HAV com eHAV.

La determinació estructural de l'HAV mitjançant rajos X ha revelat que la superfície de la càpsida de l'HAV és bastant llisa i no presenta la butxaca hidrofòbica a VP1, el qual seria el lloc on encaixaria el receptor d'altres picornavirus com per exemple els *Enterovirus* [13]. Aquest estudi ha portat a considerar que l'HAV podria entrar a les cèl·lules per un mecanisme completament diferent al de la resta de picornavirus [28], [57]

Independentment del receptor utilitzat per l'HAV i l'eHAV, s'ha suggerit que ambdós tipus de partícules virals utilitzarien rutes bastant similars per aquesta entrada, tot i que amb clares diferències entre elles [57], [59]. L'entrada d'ambdues requereix d'una endocitosis depenent de clatrina i dinamina facilitada per l'integrina  $\beta_1$  i mitjançant aquesta via endocítica el virus arribaria a l'endosoma tardà o lisosoma. També, s'ha vist que l'endocitosis depenent de caveolina juga un paper menor en l'entrada d'eHAV [59]. La desencapsidació de l'HAV és un procés bastant lent, almenys en estudis *in vitro*, en comparació amb la majoria de picornavirus [60], [61]. Aquesta té lloc gràcies a l'exposició del virus a condicions de pH baix, el qual provoca canvis conformacionals que exposen residus hidrofòbics de la càpsida i acaba conduint a la desencapsidació del genoma viral. Ara bé, en el cas de les partícules quasi-embolcallades, l'entrada és molt més lenta degut a la necessitat d'arribar al lisosoma on es degrada la seva membrana gràcies a l'acidificació i acció enzimàtica i deixa la càpsida accessible pel receptor. En canvi, l'entrada de les partícules nues és més ràpida, perquè no requereixen de tanta acidificació endosomal i per tant, sembla que poden interaccionar amb el receptor en els endosomes més temprans. D'aquesta manera, les partícules nues i les quasi-embolcallades entren per una via endocítica similar, però es desencapsiden en compartiments diferents [12], [13], [57].

El mecanisme de desencapsidació i alliberament del RNA al citoplasma tant de les partícules nues com de les quasi-embolcallades està encara per aclarir. Per una banda, s'ha suggerit que a pH baix els gangliòsids s'unirien a la càpsida i la desestabilitzarien generant un canvi conformacional que alliberés el RNA. Aquest escenari és totalment diferent de la desencapsidació d'altres picornavirus que es desencapsiden en endosomes, sent un altre exemple de com es diferencia l'HAV d'altres membres d'aquesta família [62]. Per altra banda, en un altre estudi han demostrat com l'HAVcr1 i el transportador de colesterol

NPC1 participen en l'alliberació de la *cargo* de l'eHAV i s'ha suggerit que serien els RNA lliures sense càpsida presents en les partícules quasi-embolcallades els que provocarien la infecció per l'HAV, més que no pas l'alliberament del RNA al citoplasma quan hi ha la desencapsidació de les partícules virals. La fusió de la quasi-envolta del virus i la membrana de l'endosoma tardà mitjançant la interacció HAVcr1 i NPC1 seria la que produiria un porus de fusió que permetria el pas de les càpsides i els RNA lliures cap al citoplasma, on el RNA seria transcrit iniciant la infecció per HAV. Al contrari, la desencapsidació de l'HAV semblaria ser independent de pH i requereix d'HAVcr1 o un altre receptor encara no identificat, però no hi participaria el NPC1 [63].

La proteïna VP4 sembla tenir un paper clau per dirigir la penetració de la membrana i l'alliberament del genoma viral durant l'entrada de l'HAV. A diferència del que passa en altres picornavirus, durant l'entrada de l'HAV la proteïna VP4 no requereix ser mirisitolada [64] i és capaç de produir porus en els liposomes que presenten una composició lipídica similar a la dels endosomes tardans. Això fa pensar que aquesta proteïna podria ajudar al genoma del virus a sortir de l'endosoma [65].

### **1.5.2 Traducció i replicació genòmica**

Independentment de la via d'entrada que el virus utilitzi, un cop finalitzada la desencapsidació, el RNA del virus ha de ser traduït. Com l'HAV té un genoma de RNA de polaritat positiva, un cop desencapsidat en el citoplasma ja es pot traduir. El mecanisme de traducció que utilitzen els picornavirus, i per tant també l'HAV, és cap-independent gràcies a tenir un IRES (lloc d'entrada intern del ribosoma) situat a la regió 5' NCR, el qual permet el reclutament de les subunitats ribosomals i els factors necessaris per formar el complex d'iniciació

de la traducció. L'HAV, tal i com s'ha mencionat prèviament, presenta un IRES tipus III que és molt poc eficient en dirigir la traducció [66], [67].

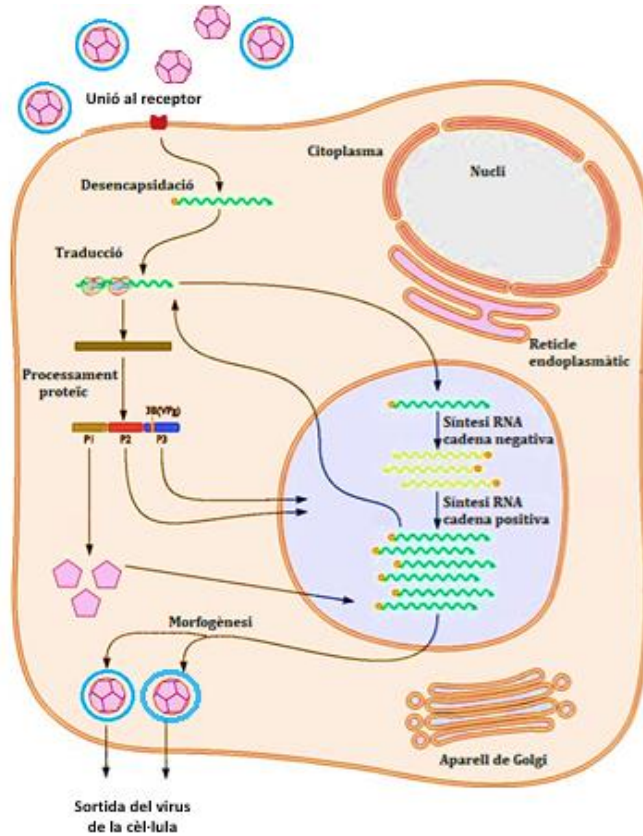


Figura 5. Cicle de replicació del HAV. Imatge adaptada de [68].

A més, a diferència dels altres membres de la família, l'HAV necessita els factors d'iniciació de traducció eucariota 4G (eIF4G) i 4E (eIF4E) intactes. Aquests dos factors són escindits o degradats, respectivament, per altres membres de la família dels picornavirus per tal d'induir el *shut-off* cel·lular, però l'HAV no té cap proteasa per processar aquests factors [16], [21]. En conseqüència, tal i com s'ha detallat en l'apartat 1.3, l'HAV ha adoptat un ús de

codons deoptimitzat respecte al de la cèl·lula hoste per garantir la traducció de les proteïnes virals [22], [23].

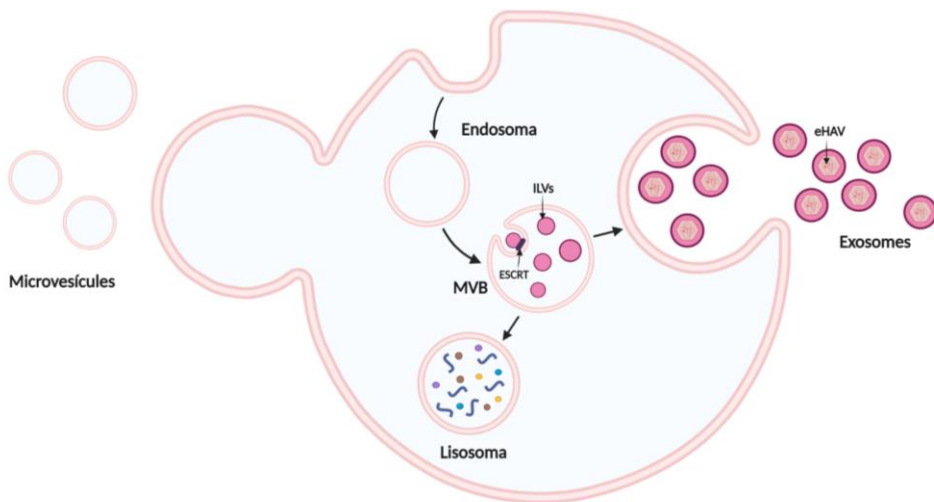
El producte de la traducció és una única poliproteïna que és processada co- i post-traduccionament. Aquest processament és necessari perquè les proteïnes estructurals i no estructurals siguin alliberades i també, perquè tingui lloc la replicació genòmica i l'assemblatge de la càpsida. El primer processament proteolític ve donat per l'acció de la proteasa 3Cpro entre les proteïnes 2A i 2B donant lloc a P1-2A (**Figura 1**) [69], [70]. Seguidament, P1-2A (o P1-pX) es plega en protòmers i la interacció de cinc d'aquests dona lloc al pentàmer, que per l'acció novament de 3Cpro és processat originant les proteïnes VP0 (que després passarà a ser VP2 i VP4) VP3 i VP1-2A (VP1-pX) [71], [72]. La proteïna 2A intervé en l'assemblatge dels protòmers per a formar els pentàmers. Sembla ser que tot i que en molts picornavirus la formació de la càpsida depèn de la N-miristolació de VP4 [73], [74], en el cas de l'HAV, tal i com s'ha comentat anteriorment, semblaria que aquesta no és necessària [64]. S'ha descrit dos models d'assemblatge en picornavirus. Un d'ells suggereix que els pentàmers es condensen al voltant del RNA víric [75], [76], mentre que l'altre proposa que primer es forma un càpsida buida i després el RNA penetra dins ella [77]. Encara no està clar quin dels dos és el que utilitza l'HAV. El tall de VP1-pX genera un extrem C-terminal de VP1 heterogeni fet que provocaria l'existència d'una barreja de diferents VP1 entre els virions madurs [78]. Recentment, amb el nou paradigma de la biologia de l'HAV, s'ha descrit que la proteïna VP1 es troba en la càpsida dels virions nus, mentre que la VP1-pX forma part de la càpsida dels virus quasi-embolcallats. Això indica que la escissió de VP1-pX es produiria un cop el virus hagués perdut la quasi-membrana [12], [13]. El tall de VP0 ve donat per una activitat proteolítica desconeguda fins al moment i origina la VP4 i VP2, donant lloc als virions madurs incrementant la seva infectivitat [79].

El RNA genòmic és utilitzat com a motlle per la RNA polimerasa RNA dependent vírica (3Dpol) per produir còpies complementàries del genoma que tornaran a ser copiades donant lloc a nous genomes. Aquesta replicació del genoma víric es duu a terme en complexos de replicació formats per membranes cel·lulars reordenades, les quals contenen proteïnes cel·lulars i víriques que juntament amb la 3Dpol duen a terme la transcripció del genoma víric en RNA antisentit. Aquests complexos s'anomenen xarxes vesícula-tubulars i no està clar si es troben en el reticle endoplasmàtic [80], [81] o en la membrana mitocondrial externa [82]. La transcripció comença amb la nucleotidització d'una tirosina de la proteïna VPg (3B) per l'acció de la 3Dpol. La polimerasa utilitza com a anclatge i motlle per iniciar la replicació l'estructura secundària anomenada element *cis-regulador* (*cis-acting RNA element, cre*) localitzat a prop de l'extrem 5' de la seqüència codificant de 3Dpol. Aquest element *cre* proporciona un grup hidroxil lliure a la proteïna VPg que pot ser prolongat per la 3Dpol. Posteriorment, el complex saltaria cap a la cua de poli(A) per prosseguir amb la replicació [83].

### 1.5.3 Sortida del virus de la cèl·lula

La sortida de l'HAV dels hepatòcits es realitza principalment en forma de partícules quasi-embolcallades (eHAV). Es creu que la biogènesis d'eHAV podria utilitzar les vies pròpies que la cèl·lula utilitza per a la biogènesis dels exosomes cel·lulars. S'ha suggerit que el virus sortiria de la cèl·lula embolcallat mitjançant un procés que depèn de proteïnes cel·lulars associades al complex ESCRT, el qual implica la secreció a través de la via dels cossos multivesiculars (MVB) (**Figura 6**) [84]. Les càpsides virals es recluten des del lloc de replicació i empaquetament del RNA fins als endosomes tardans, on es produeix la interacció de les càpsides amb el complex ESCRT-III, afavorint la formació de MVB. Els MVB amb vesícules intraluminals (ILV) que contenen càpsides d'HAV,

es dirigeixen a la membrana plasmàtica on la fusió de la membrana limitant dels MVB amb la membrana plasmàtica resulta en l'alliberació extracel·lular dels exosomes amb les càpsides de l'HAV dins seu. Aquests exosomes envoltant les càpsides de l'HAV és el que s'ha definit com a fenotip quasi-embolcallat de l'HAV [12], [28], [85], [86].



**Figura 6. Sortida de l'HAV de la cèl·lula.** Les microvesícules (esquerra) es generen de la gemmació i fissió directa de la membrana plasmàtica, mentre que els exosomes (en rosa, dreta) són produïts a través del trànsit dels MVB, els quals es fusionen amb la membrana plasmàtica i alliberen els ILV com a exosomes a l'espai extracel·lular. Imatge creada a partir de [84], [87]–[90].

L'HAV replica en els hepatòcits, i potser en enteròcits, i hi ha controvèrsia a l'hora de definir com es fa la sortida a través de les membranes basolateral i apical. En un estudi realitzat amb cèl·lules CaCo-2 diferenciades (cèl·lules derivades de carcinoma de còlon), les quals polaritzen de forma similar a les cèl·lules epitelials de l'intestí prim [91], la progènie vírica sortia gairebé exclusivament a través de la membrana apical [46]. Contràriament, en un altre estudi realitzat amb hepatòcits humans polaritzats en monocapes columnars,



pràcticament tots els virus sortien a través de la membrana basolateral [92], fet força inexplicable donat que en la infecció natural hi ha una gran sortida des de la membrana apical cap al canalicle biliar i després a l'intestí. Altres estudis més recents, realitzats també amb hepatòcits humans polaritzats *in vitro*, mostrarien que la sortida seria més equilibrada entre ambdues membranes [93].

### 1.6 Resposta immune i mecanismes d'evasió

La infecció per HAV resulta en dany hepàtic, el qual es manifesta clínicament per un augment dels nivells sèrics d'enzims del fetge com l'alanina aminotransferasa (ALT). El dany hepàtic no és causat directament per la infecció, sinó que és causat pels mecanismes de defensa del sistema immune que es desencadenen durant la infecció.

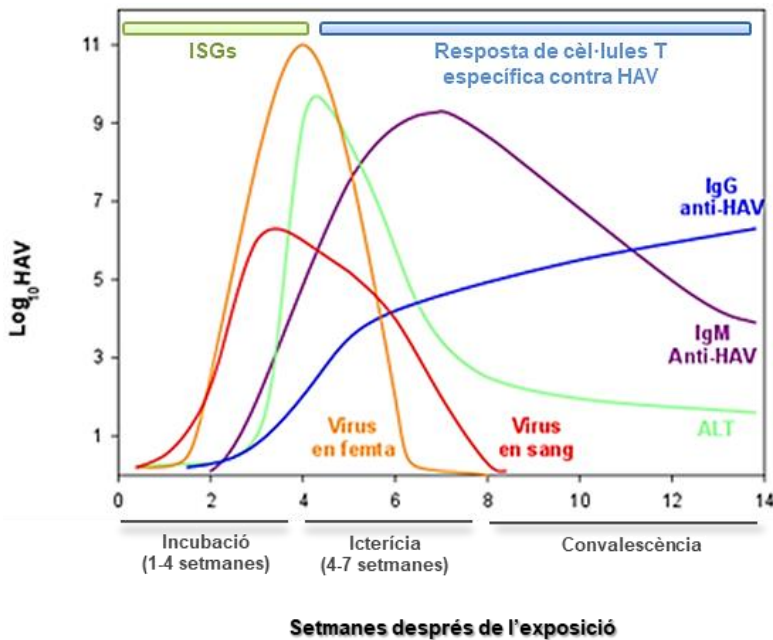
El receptor endosomal tipus Toll 3 (TLR3, *Toll-like Receptor 3*), les helicases citosòliques tipus RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*) [94] i la proteïna MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) són els principals PRR (*pathogen-associated pattern recognition receptors*) implicats en el reconeixement de l'HAV. Aquests receptors estimulen les vies de senyalització que condueixen a la inducció de l'estat antiviral [95], [96], la qual cosa conflueix en la síntesi d'interferó (IFN) a través de les proteïnes adaptadores específiques TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$* ) i MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*). Tot i que els virus generalment indueixen la síntesi d'IFN, s'ha vist que durant la infecció per HAV, l'activació de gens estimulats per IFN tipus I (*IFN-stimulated genes* or ISG) és molt limitada [97], [98]. L'expressió d'IFN és bloquejada a través de precursors proteics codificats a la regió P3 del genoma de l'HAV. MAVS i TRIF són proteïnes cel·lulars adaptadores centrals que juguen un paper crític en la senyalització dirigida per RIG-I i MDA-5. La seva

activació indueix l'expressió d'IFN de tipus I mitjançant l'activació de la transcripció NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [99] i IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) [82]. Una de les estratègies de l'HAV es basa en la degradació proteolítica de MAVS i TRIF mitjançant els precursors de la proteasa viral, 3ABC i 3CD, respectivament. Aquest clivatge altera la via de senyalització, inhibint així la resposta IFN tipus I [96]. També, s'ha descrit que la proteasa 3C s'encarrega del clivatge de NEMO (*NF-kappa-B essential modulator*, també conegut com *IKBKG*), un factor necessari per a l'expressió d'IFN- $\beta$  i l'activació de NF- $\kappa$ B [99]. A més, s'ha demostrat que l'HAV pot bloquejar la producció d'IFN- $\beta$  mitjançant el clivatge de TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), la qual és també una proteïna adaptadora clau en les vies de senyalització d'IFN tipus I senyalitzades per RIG-I i MDA-5 [100].

Les pDCs (cèl·lules dendrítiques plasmacitoides) produeixen grans quantitats d'IFN tipus I quan reconeixen virus o àcids nucleics foranis presents en el citoplasma via els receptors TLR7 (*Toll-like Receptor 7*) i TLR9 (*Toll-like Receptor 9*) [101], [102]. Els virions d'eHAV són els que són detectats per les pDC estimulant una gran quantitat d'IFN $\alpha$ . Tanmateix, s'ha observat que les pDC desapareixen del fetge infectat després del pic de la virèmia. Aquesta desaparició podria ser una altra explicació del per què d'aquesta baixa producció d'IFN en una infecció per HAV [56]

La resposta immune cel·lular i humoral específica contra l'HAV comença al voltant de les 3-4 setmanes després de la infecció (**Figura 7**). Quan comencen els símptomes, es comencen a detectar IgM, IgA i IgG en sang. Aquesta aparició d'anticossos neutralitzants correlaciona amb un descens en la virèmia i quantitat de virus excretats en femta [103], [104]. Els nivells d'anticossos IgM disminueixen fins a nivells indetectables als 4-6 mesos aproximadament després de la infecció [105]. Els nivells d'IgA en sang arriben als seus nivells

màxims als 2 mesos després de l'exposició al virus i poden durar fins a 5 anys [106]. Inclús, complexos HAV:anti-HAV IgA són presents en les femtes d'alguns individus durant les fases tardanes de la infecció aguda [107]. Els nivells d'IgG són baixos al principi i incrementen durant la resposta immune contra HAV. Les IgG tenen un important paper neutralitzant i, mentre que la resposta d'IgM és normalment curta, la resposta d'IgG persisteix en el temps proporcionant protecció a l'individu en front a reinfeccions [103], [104].



**Figura 7. Esdeveniments virològics, serològics i immunològics típics durant el curs d'una infecció per hepatitis A.** Imatge adaptada de [108].

No està gens clar com els anticossos neutralitzen el virus. L'observació de que la gran majoria, si no totes, les partícules d'HAV circulant en la sang estan envoltades per membranes de la cèl·lula hoste, ha despertat l'interès per entendre la susceptibilitat del virus front als anticossos neutralitzants. Es creu

que les partícules eHAV no són reconegudes pels anticossos i això fa pensar que aquestes membranes han de trencar-se en algun moment per a què el virus pugui ser neutralitzat [12]. Probablement, aquesta neutralització es donaria en els endosomes tardans o lisosomes, un cop iniciada la infecció, on gràcies als enzims hidrolítics es produiria el trencament de les membranes [13].

Tal i com s'ha mencionat, el dany hepàtic és causat per la forta resposta immune front a l'HAV. El paper de les cèl·lules T en provocar dany hepàtic s'ha analitzat en diversos estudis on han trobat que l'aparició de cèl·lules T en el fetge tendeix a coincidir amb l'increment d'ALT en el sèrum durant la fase aguda de la infecció [109](**Figura 7**). Fins fa relativament poc, es creia que els limfòcits T CD8+ tenien un paper crucial en la fase aguda de la infecció, però recentment, en un estudi fet en ximpanzés no s'ha detectat limfòcits T CD8+ específics contra HAV durant la fase aguda de la infecció. En canvi, s'ha trobat alts nivells de limfòcits T CD4+. Aquests resultats suggereixen que són realment els limfòcits T CD4+ els que controlen la resposta immune contra HAV i no els CD8+ [110]. Al contrari del que fan la majoria de patògens, l'HAV inhibeix temporalment l'activitat supressora de les cèl·lules  $T_{reg}$  durant la fase aguda de la infecció i també, en disminueix la seva freqüència en sang. Això provoca que no hi hagi un manteniment de la homeòstasis immune i condueix a un dany hepàtic sever [111], [112]. En quant al paper de les cèl·lules *natural killer* (NK) en el sistema immune innat antiviral, aquestes sempre han sigut rellevants gràcies a la seva activitat citotòxica i la producció de citoquines a través de senyals d'activació i inhibició. Tot i així, el fenotip i les funcions d'aquestes no es coneixen suficient en les infeccions per HAV [52].

## 1.7 Manifestacions clíniques

L'hepatitis A és una inflamació aguda del fetge produïda per l'HAV. La infecció aguda en adults sol ser una malaltia autolimitada i el virus, a diferència d'altres virus d'hepatitis com el virus de l'hepatitis B o l'hepatitis C, no produeix una infecció crònica [113]. L'espectre clínic de la infecció pot anar des d'una infecció asimptomàtica fins a una hepatitis fulminant (menys de l'1% dels casos)[114].

La malaltia està diferenciada en 4 etapes: incubació, prodròmica, aguda i convaléscent (**Figura 7**). El període d'incubació dura al voltant d'1-4 setmanes (mitjana de 28 dies) i durant aquest període el pacient és asimptomàtic, tot i ser el moment de major replicació vírica. El període prodròmic es caracteritza per l'aparició de símptomes indistingibles d'altres hepatitis, que són nàusees, vòmits, anorèxia, febre, malestar, cansament i dolor abdominal [115], [116]. La infecció simptomàtica es dona en el 70-90% dels adults infectats, mentre que els símptomes són poc comuns (<30%) en nens menors de 6 anys d'edat [117]. La durada d'aquesta fase és d'entre 3 a 7 dies i normalment acaba o es veu bastant disminuïda quan apareix la icterícia. La fase aguda comença quan hi ha evidència d'icterícia i s'observa en un 40-80% dels casos simptomàtics. Aquesta etapa es caracteritza per una orina fosca i un esgrogueïment de la pell i les membranes mucoses. La durada pot variar des de 4 fins a 22 dies, durant els quals es pot detectar un increment de les transaminases en sang [118]. En la majoria dels casos (85%), els símptomes clínics solen acabar en menys de 2 mesos i els pacients solen recuperar-se completament generant immunitat de per vida front a una reinfecció per l'HAV. El període de convallescència té una durada d'unes 4 setmanes [116].

Durant el període d'incubació, tal i com s'ha esmentat, hi ha la replicació vírica, podent-se detectar virus en sèrum (virèmia) des d'abans de l'aparició dels primers símptomes fins a aproximadament 6 setmanes després, arribant a valors de  $10^6$  còpies genòmiques/ml (**Figura 7**). En femta es poden arribar a detectar fins a  $10^{11}$  còpies genòmiques/ml [15]. El virus és també detectat en saliva, però en unes concentracions molt més baixes [119]. Per tant, en aquesta fase de la malaltia és on hi ha el risc de transmissió més elevat i els individus infectats es mantenen contagiosos fins aproximadament 1 setmana després d'aparèixer la icterícia [120]. La virèmia acaba poc després de l'aparició dels símptomes, però el virus es segueix excretant en femtes 1 o 2 setmanes més [98].

Tot i que la majoria d'individus infectats es recuperen completament, en alguns casos (<15%) la malaltia pot allargar-se i experimenten una recaiguda dels símptomes durant els sis mesos posteriors a la fase aguda. La recaiguda és generalment menys severa que l'hepatitis inicial i la seva durada és inferior a 3 setmanes[121]–[123]. La causa de l'hepatitis recurrent es desconeix i no s'han detectat factors predisposants [123]. No obstant, segons un estudi fet amb ximpanzés es creu que la recaiguda podria estar associada a una ràpida disminució de les respostes de cèl·lules T CD4+ específiques contra virus [110].

En menys d'1% dels casos pot haver-hi insuficiència hepàtica fulminant, la qual té una elevada taxa de mortalitat sense transplantament hepàtic [124], [125]. L'hepatitis fulminant s'ha associat amb nivells significativament alts de bilirubina i baixos de RNA víric en sèrum. Això suggereix que la insuficiència hepàtica no és deguda a un efecte directe del virus, sinó a la forta resposta immune front al virus, responsable de la reducció observada de la càrrega viral [126]. Tanmateix, en altres estudis s'associa també amb alts nivells del virus [127].

Els individus infectats que tenen un elevat risc de malaltia severa acostumen a ser majors de 50 anys, immunodeprimits o aquells que pateixen alguna malaltia hepàtica, particularment degut a hepatitis B i C [128]. En dones embarassades, la infecció aguda per HAV s'ha associat amb un major risc de part prematur i complicacions gestacionals [129].

### **1.8 Vies de transmissió**

L'HAV és de transmissió fecal-oral, ja sigui a través del contacte estret persona a persona o per ingestió d'aliments o aigua contaminats. L'HAV és molt resistent a temperatures extremes, a pH baix i a agents químics i físics, fet que li permet sobreviure en moltes superfícies ambientals, pell humana, aliments i aigües residuals [130], [131]. Aquesta destacada resistència ve donada per una càpsida excepcionalment estable, que es podria explicar per un plegament co-translacional controlat per la cinètica de traducció dirigida per l'ús de codons [22], [132]

També, pot transmetre's freqüentment a través d'objectes inanimats contaminats. Aquesta transmissió provoca que el virus es propagui fàcilment dins d'un nucli familiar o llocs on convisquin varies persones (com per exemple una escola o una residència). En aquests llocs, l'HAV es propaga ràpidament degut al seu llarg període d'incubació, fet que provoca que un individu infectat sigui contagiós durant 1 mes abans de l'inici dels símptomes. A més, s'ha de tenir en compte que els nens menors de 6 anys son asimptomàtics i són el principal reservori del virus en àrees on la infecció és endèmica [133], [134].

També, s'ha descrit casos on la infecció ha sigut transmesa per pràctiques sexuals oro-anals i l'ús de drogues injectables, de fet tan els homes que tenen

sexe amb homes (MSM) com les persones sense llar drogo-depenents son considerats grups d'alt risc. Més rarament, s'ha transmès mitjançant transfusions de sang o hemoderivats procedents de donants infectats, tatuatges i pràctiques dentals poc higièniques [135], [136].

## 1.9 Incidència i vigilància epidemiològica

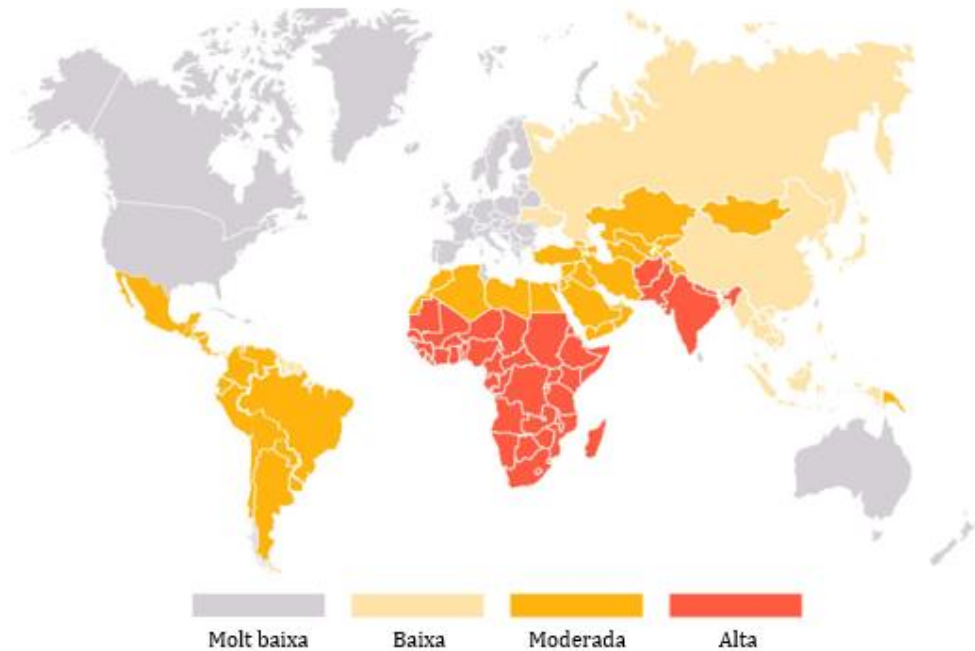
L'Organització Mundial de la Salut (OMS) estima que hi ha 1,5 milions de casos d'hepatitis A aguda i aproximadament 7.000 morts per any en el món [137], sent el tipus d'hepatitis viral més reportat anualment [138]. Molt probablement aquestes dades estan subestimades a causa de l'elevat nombre de casos asimptomàtics i les limitacions del control epidemiològic. Molt poques infeccions simptomàtiques són finalment declarades com a hepatitis A per diferents motius: les persones malaltes no sempre busquen assistència mèdica, els diagnòstics no sempre són correctes o la informació no sempre arriba a les autoritats sanitàries competents [139].

La taxa d'incidència de les infeccions varia àmpliament en diferents parts del món (**Figura 8**), la qual cosa està estretament relacionada amb les condicions socio-econòmiques (sanejament, qualitat de l'aigua, ingressos,...) del país. Les àrees del món es classifiquen per tenir una endemicitat per hepatitis A alta, moderada o baixa. El patró epidemiològic té implicacions importants en l'edat mitjana d'exposició al virus i, per tant, en la gravetat de la infecció.

Als països subdesenvolupats, que inclouen bona part d'Àfrica, Àsia i Amèrica del Sud i Central, l'hepatitis A és una infecció endèmica que la majoria de persones adquireixen durant la infància, sent sovint asimptomàtica. La infecció indueix una immunitat per a tota la vida i per tant, la infecció en adults



és poc freqüent. Aquestes condicions contribueixen a la propagació del virus, però amb una taxa de la malaltia relativament baixa. És per això que en aquestes zones altament endèmiques no solen haver-hi brots.



**Figura 8. Prevalença global del virus de l'hepatitis A.** Imatge adaptada de [140].

En canvi, en països desenvolupats, com Europa, Amèrica del Nord, gran part d'Àsia i Austràlia, la endemicitat és molt més baixa i pràcticament el virus no circula. Gràcies a unes bones condicions higièniques i sanitàries, la majoria d'infants eviten la infecció, el que provoca que una proporció elevada d'adults sigui susceptible a la infecció. En aquestes regions el risc d'infecció és baix, però esporàdicament, poden produir-se infeccions degut a viatges a països on el virus és endèmic o mitjançant el consum d'aliments provinents d'aquestes regions endèmiques. Aquestes infeccions esporàdiques provoquen que les taxes

màximes d'infecció tendeixin a ser en adolescents i joves, desenvolupant una malaltia més severa. El desplaçament de la corba de seroprevalença cap a edats més avançades comporta que hi hagi unes taxes de malaltia d'hepatitis A superiors que en regions subdesenvolupades, on l'hepatitis A és endèmica. Aquest desplaçament implica un increment en la morbiditat, mortalitat i en els costos associats a la malaltia (personal sanitari, tractament, dies laborals perduts, etc.). Conjuntament, aquests fets porten a una paradoxa epidemiològica: quants més casos d'hepatitis A té un país, més protegit està aquest país contra el virus [114], [141]–[143].

En els darrers anys, s'ha vist un increment general dels casos de malaltia per HAV registrats en països desenvolupats indicant un nou risc associat a la globalització i als moviments de població [144]–[152].

## **1.10 Importància sanitària i diagnòstic**

La taxa de mortalitat de l'hepatitis A és de 1-5 per cada mil casos, podent incrementar en persones de més de 65 anys d'edat. Aquesta taxa és rellevant quan hi ha un brot amb milers de pacients [128]. Tenir a l'abast una bona tècnica de diagnòstic és fonamental i pot donar informació rellevant per contenir un brot.

L'hepatitis A no pot distingir-se d'altres tipus d'hepatitis vírica basant-se únicament en les característiques clíniques o epidemiològiques [2]. Per confirmar el diagnòstic d'infecció aguda per HAV es requereixen proves serològiques mitjançant immunoassajos. Aquestes es basen en la detecció d'anticossos IgM anti-HAV, els quals estan presents en pràcticament tots els pacients entre els 5 i 10 dies abans de l'aparició dels símptomes i poden persistir

fins a 6 mesos. Aquesta detecció permet confirmar la infecció per HAV durant la fase aguda o de convalescència precoç [153][154].

També, es pot utilitzar la prova d'anticossos totals anti-HAV, la qual mesura tant IgG com IgM anti-HAV. Aquesta prova permet distingir entre una infecció actual o una passada. Com s'ha mencionat anteriorment, les IgG anti-HAV apareixen en la fase de convalescència de la infecció i persisteixen en el sèrum durant tota la vida de la persona, conferint una protecció duradora contra la malaltia. Per tant, les persones que són anti-HAV totals positives i IgM anti-HAV negatives, tenen marcadors serològics que indiquen una infecció passada o una vacunació anterior [154], [155].

Tot i que els immunoassajos són el mètode de referència per confirmar el diagnòstic d'infecció per a HAV, aquests no són sempre útils per detectar infeccions recents donant falsos negatius. Per complementar o confirmar resultats serològics, es poden utilitzar mètodes moleculars com ara assajos basats en la reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) per amplificar i si cal seqüenciar genomes virals. Aquests assajos poden ser útils pel diagnòstic de pacients sense anticossos específics anti-HAV i per la vigilància de la infecció. Les mostres s'obtenen de la femta, sèrum o saliva de pacients durant el període de virèmia de la infecció. També, són útils per investigar brots d'hepatitis A de font comuna, ja que mitjançant seqüenciació permeten determinar la relació genètica entre els aïllats [153], [156]–[158].

## 1.11 Estratègies per al control i la prevenció de l'hepatitis A

Actualment, no hi ha un tractament específic disponible per hepatitis A, només existeix el tractament pal·liatiu. Per tant, les estratègies per al control i la prevenció contra la infecció d'HAV són extremadament importants per reduir el número de casos d'hepatitis A per any. Aquestes estratègies estan enfocades en tres camps.

En primer lloc, donat que la seva via de transmissió és fecal-oral, és fonamental un bon sanejament de l'aigua i el menjar abans de ser consumit i una pràctica d'higiene personal adequada, com rentar-se bé les mans després d'utilitzar el bany o abans de preparar menjar. També, és important dur a terme pràctiques sexuals segures que inclouen reduir el número de companys sexuals i evitar pràctiques de risc per la transmissió del HAV entre el col·lectiu MSM.

En segon lloc, la injecció intramuscular d'immunoglobulines (Igs) anti-HAV que provenen de plasma de donants serveix com a mètode profilàctic pre- i post-exposició [133]. És utilitzada com a protecció temporal i pot servir per prevenir la infecció quan s'administra abans o durant les 2 primeres setmanes després d'una exposició. Quan s'administra com a profilaxis pre-exposició, 1 dosi de 0.02mL/kg confereix protecció enfront a la malaltia fins a un màxim 3 mesos i 1 dosi de 0.06mL/kg confereix protecció per 3-5 mesos. Quan s'administra durant les 2 primeres setmanes post-exposició, 1 dosi de 0.02mL/kg prevé la malaltia en un 80-90% dels casos. Cal tenir en compte que la concentració d'IgG anti-HAV aconseguides després de la seva administració estan per sota dels nivells de detecció de la majoria de kits de diagnòstic utilitzats. La injecció d'Igs la reben persones que han estat en contacte amb persones infectades per HAV, ja sigui perquè viu amb algú que té la malaltia o perquè han tingut relacions

sexuals o compartit il·legalment drogues sense una bona pràctica d'higiene amb una persona infectada. També, és recomanable posar-se una injecció abans d'un viatge a una zona endèmica d'HAV [159], [160].

En tercer lloc, actualment el component clau per a la prevenció de l'hepatitis A és la immunització activa mitjançant vacunació. Les vacunes tenen diversos avantatges respecte l'administració d'Igs, entre els quals cal destacar la protecció a llarg termini i la fàcil administració. No obstant, l'administració d'Igs encara es recomana en nens menors de 2 anys per la presència d'anticossos anti-HAV adquirits passivament de la mare, els quals podrien interferir amb l'efectivitat de la vacuna [161].

Diverses vacunes inactivades amb formaldehid altament segures i efectives han estat disponibles des del principi dels anys 90 a Europa i els Estats Units [162]–[164] i també, hi ha vacunes atenuades a la Xina (detallades a l'apartat **1.10.2**). Tot i que hi ha diferents estratègies de vacunació específiques segons l'epidemiologia de la infecció i de les polítiques locals en cada país [165], al llarg dels anys, s'ha vist que totes les campanyes de vacunació contra l'HAV són efectives a l'hora de disminuir la incidència de la malaltia. Cal recalcar, però, la importància que té completar la pauta de vacunació establerta per evitar l'aparició de noves variants que puguin escapar de la vacuna [166].

S'ha de tenir en compte, que malgrat que la vacuna sigui el millor mètode de prevenció, hi ha molts països subdesenvolupats on no existeix un programa de vacunació universal. Aquesta manca de disponibilitat de vacunes és degut principalment a la limitada replicació de l'HAV *in vitro* que en part explica els elevats costos de la vacuna. Aquest cost és un gran inconvenient en països i regions pobres [15].

### 1.11.1 Antivirals

Els antivirals disponibles eficients contra l'HAV són escassos i, per tant, hi ha una certa necessitat a desenvolupar més drogues antivirals que actuïn contra l'HAV. S'ha observat que els antivirals existents són segurs i redueixen el període de la malaltia, els símptomes i els costos econòmics en pacients infectats no vacunats [15]. Actualment, estan classificats en dues categories: els antivirals d'acció directa (*direct-acting antivirals*, DAAs) i els que tenen com a diana l'hoste (*host-targeting agents*, HTA) [167], [168].

Dins dels antivirals que tenen com a diana específica el virus (DAAs), s'inclou inhibidors de la proteasa, de la polimerasa i de l'IRES. Aquests antivirals no tenen cap efecte advers com el que pot ser provocat pels antivirals dirigits a l'hoste (HTAs), com ara síndrome gripal, efectes hematològics o depressió [169]. Pel que fa als antivirals HTAs, destaquen diferents tipus d'interferó, la ribavirina, l'amantidina i varis agents que actuen contra factors cel·lulars o enzims. Els HTA tenen mecanismes d'acció complementaris als dels DAA i per tant, ambdós tipus d'antivirals solen actuar sinèrgicament. Aquesta cooperació entre els dos, fa que sigui igual d'important produir nous DAAs com HTAs [168], [170]–[172].

Recentment, s'ha descobert un antiviral, anomenat dihidroquinolizina RG7834, que administrat oralment suprimeix la replicació viral i reverteix la inflamació del fetge en un model de ratolí d'HAV [173]. Aquest antiviral també s'està estudiant contra el virus de l'hepatitis B [174].

### 1.11.2 Vacunes

Les vacunes inactivades s'han desenvolupat a Europa i EEUU i posteriorment, a la Xina. En canvi, les vacunes atenuades han sigut desenvolupades a la Xina [175]–[177] i han sigut recentment llicenciades en només alguns països (Tailàndia, Índia, Filipines, Bangladesh i Guatemala)[162].

Les vacunes inactivades inclouen: AVAXIM® (Sanofi Pasteur), EPAXAL® (Crucell/Berna Biotech), HAVRIX® (GSK) i VAQTA® (MerckSD) (**Taula 2**). Totes elles utilitzen hidròxid d'alumini com a adjuvant [28], [162], excepte l'EPAXAL®, on el virus es troba adsorbit a la superfície de virosomes d'Influenza reconstituïts (IRIVs) [178], [179]. També, s'ha produït la vacuna HEALIVE (Sinovac Biotech) a la Xina [180]. A més a més, també existeixen dues vacunes combinades que són la Vivaxim® (Sanofi Pasteur), la qual protegeix de l'HAV i la febre tifoide provocada per *Salmonella typhi*, i la Twinrix® (GSK), la qual protegeix de l'HAV i del virus de l'hepatitis B [181]. Totes les vacunes inactivades són preparats de virus sencers que es produeixen fent replicar soques d'HAV en cultius de cèl·lules diploides humanes i que posteriorment són inactivats amb formaldehid [179].

Les vacunes inactivades són administrades en dues dosis intramusculars. La primera dosi s'administra entre el primer i segon any de vida i la segona dosi ha de ser administrada almenys 6 mesos després de la primera. Concretament, a Catalunya la primera s'administra als 15 mesos i la segona s'administra als 6 anys d'edat [182], ja que segons un comunicat de la OMS, la segona dosi es pot administrar fins a 5 anys més tard de la primera i seguir sent igual d'efectiva [162]. Durant més de 20 anys s'han administrat cents de milions de dosis i s'ha comprovat que després de les dues dosis, aquestes vacunes són

segures i presenten una elevada eficàcia protectora. Tot i així, la necessitat d'administrar dues dosis, incrementa molt el cost de la vacuna [28], [162]

**Taula 2. Vacunes disponibles de l'Hepatitis A.** Informació extreta de [145], [157]–[160], [166]

Tipus de vacunes	Nom	Soca atenuada d' HAV	Adjuvant	Fabricant
Inactivades	HAVRIX®	HM175	Hidròxid d'alumini	GlaxoSmithKline (GSK)
	VAQTA®	CR-326F	Hidròxid d'alumini	MerckSD
	AVAXIM®	GBM	Hidròxid d'alumini	Sanofi Pasteur
	HEALIVE	TZ84	Hidròxid d'alumini	Sinovac Biotech
	EPAXAL®	RG-SB	Virosomes	Crucell/Berna Biotech
	Vivaxim®	GBM (recombinada amb la soca Ty2 de Salmonella typhi)	Hidròxid d'alumini	Sanofi Pasteur
	Twinrix®	HM175 (recombinada amb Hepatitis B)	Hidròxid d'alumini	GlaxoSmithKline (GSK)
Vives atenuades	Biovac-A	H2	-	Zhejiang Pukang Biotech
	HAVAC	LA-1	-	Changchun Inst. Of Biologic Products

S'ha de tenir en compte que les vacunes inactivades contra HAV es van començar a comercialitzar als anys 90 i per tant, hi ha molts adults que no estan vacunats actualment contra HAV. La OMS recomana que els adults que no estan vacunats i vulguin rebre la vacuna, sol·licitin la seva administració. També, està recomanat vacunar-se si formes part dels grups d'alt risc, inclosos viatgers internacionals, persones amb alguna malaltia crònica del fetge, persones amb SIDA, homes que tenen sexe amb homes, persones que prenen drogues



injectables, etc. Addicionalment, una persona que hagi estat en contacte amb algú que tingui hepatitis A, també hauria de rebre la vacuna el més aviat possible i durant les dues primeres setmanes post-exposició o tal i com hem comentat anteriorment, la dosis corresponent d'Igs [162]. És important també vacunar a la població immunocompromesa per prevenir l'aparició de variants d'escapament a la vacuna [166].

Pel que fa a les vacunes vives atenuades, la informació és molt limitada. Se'n coneixen dues: Biovac-A (Zhejiang Pukang Biotech) i HAVAC (Changchun Inst. Of Biologic Products) (**Taula 2**). Aquestes vacunes són administrades subcutàniament en una sola dosis [164], [175]. Al llarg dels anys, Xina ha demostrat la immunogenicitat, l'eficàcia i seguretat d'aquestes vacunes que tenen com a avantatge que són de més baix cost, ja que s'administren en una sola dosis [184].

### **1.12 Impacte de la introducció del programa universal de vacunació**

Després de la implementació de programes universals de vacunació, els casos d'hepatitis A han disminuït dràsticament en diferents països i regions arreu del món [113]. A partir dels resultats obtinguts pel que fa a la seguretat i protecció de les vacunes anti-HAV inactivades, així com la relació cost-efectivitat d'aquestes, s'aconsella la implementació de la vacunació massiva universal (UMV) en nens.

A Catalunya, gràcies a la implementació de programes universals de vacunació, els casos d'hepatitis A han disminuït dràsticament. No obstant, durant el període 2002-2009 el descens no ha sigut constant, observant-se

increments de casos que han sigut associats a diversos gran brots que hi ha hagut durant el període de post-vacunació [138], [185], [186]. En els següents anys, les taxes d'incidència d'hepatitis A van tornar a baixar fins a nivells molt baixos, però inesperadament al 2013 es va tornar a veure un increment de casos simptomàtics en nens per sota els 5 anys d'edat, els quals normalment no tenen símptomes. La principal causa d'una aparició esporàdica de casos és la incompleta pauta de vacunació, especialment en pacients immunodeprimits, la qual cosa crea les condicions òptimes per aïllar variants d'escapament a les vacunes. L'increment de casos en nens menors de 5 anys va estar associat a l'aparició del genotip IIIA provinent d'Àsia, particularment de Pakistan, el qual era poc comú a Europa i EEUU i va provocar més casos clínics en aquest grup d'edat dels prèviament esperats [113].

En els últims 10 anys, cinc brots d'origen alimentari han afectat arreu del món. El primer d'aquests grans brots va tenir lloc l'any 2013 en 4 països del Nord d'Europa (Dinamarca, Finlàndia, Noruega i Suècia). Aquest brot es va associar al consum de maduixes congelades provinents d'Egipte i va causar 106 casos [187]. Al mateix any, va haver un segon brot a 9 estats dels EEUU produït pel consum de llavors de magrana congelada importades de Turquia i hi va haver 162 casos [188]. També al 2013, va començar un gran brot que va durar fins al 2014 a 11 països Europeus (Bulgària, Dinamarca, França, Alemanya, Irlanda, Itàlia, els Països Baixos, Noruega, Polònia, Suècia i Regne Unit), el qual probablement va ser degut a maduixes congelades. Aquest brot va causar més de 1500 casos i 3 morts [189]. El quart brot va esdevenir a Hawaii l'any 2016, el qual es va associar a vieires crues provinents de Filipines i va causar 292 casos i 2 morts [190]. L'any 2016 també va haver-hi un brot en 9 estats dels EEUU amb 143 casos i va ser relacionat amb maduixes congelades utilitzades en un cafè per fer batuts [191]. També, més recentment ha tingut lloc un brot que va començar

al maig del 2022 als EEUU que ha causat més d'una vintena de casos confirmats i s'ha associat a maduixes fresques importades de Mèxic [192].

Per altra banda, cal destacar els brots que es donen en homes que tenen sexe amb homes (MSM), el qual és un grup amb un elevat risc de contraure hepatitis A degut a pràctiques sexuals de risc. Varis brots que han afectat al grup MSM han tingut lloc en la nostra àrea. Al juny del 2016, va començar un brot enorme que va afectar a més de 4000 individus, amb el 50% dels casos i 3 morts identificades a Espanya [193].

També és rellevant mencionar un brot als EEUU que va afectar als consumidors de drogues sense llar durant l'any 2017. Es van reportar més de 1500 casos en total, d'entre els quals 41 morts [194].

Mes recentment, segueixen havent-hi brots d'hepatitis A com per exemple, el brot a Irlanda que va començar el novembre del 2020, en el qual una vintena de casos van ser confirmats i encara no s'ha pogut detectar la font d'infecció [195].

Tenint en compte que segueixen havent-hi brots esporàdics arreu del món degut a la falta de vacunació, està clar que la manera més efectiva de prevenir-los és mitjançant la vacunació massiva infantil, en adults en grups de risc o persones que viatgen a països endèmics. L'HAV replica molt lentament en cultiu cel·lular, i això ha conduït a què en ocasions, durant grans brots d'hepatitis A, hi hagi problemes de subministrament de la vacuna, la qual cosa afecta a la seva comercialització a varis països Europeus i també EEUU. Aquesta situació complica el control de brots [196]. Per tant, el gran repte que hi ha actualment és trobar vacunes amb una eficàcia similar o superior a les actuals, però més

econòmiques i assequibles que solucionin l'escassetat de vacunes contra l'hepatitis A.

### 1.13 Estudis i adaptació de l'HAV a cultiu cel·lular

El gran avenç d'Enders et al. en la propagació del poliovirus en cèl·lules de teixits embrionaris el 1949, va obrir el camí al cultiu de virus en línies cel·lulars [197]. Des de llavors, l'adaptació de virus patògens humans a línies cel·lulars *in vitro* per mitjà de passatges successius s'ha utilitzat en virologia per l'aïllament i la propagació de molts virus. Aquesta adaptació condueix a l'atenuació dels virus reduint el seu potencial per provocar malalties en humans [198], [199]. Gràcies a les soques víriques adaptades a cultius cel·lulars s'ha pogut crear línies sòlides de treball per facilitar l'estudi de la biologia dels virus i de les malalties que provoquen. A més a més, també han sigut àmpliament utilitzades pel desenvolupament de molts antivirals i vacunes amb més èxit produïdes fins al moment (com per exemple les de la poliomielitis, xarampió, galteres, rubèola i varicel·la) [200].

El virus salvatge de l'HAV sol ser refractari a multiplicar en cultiu cel·lular, i quan ho aconsegueix sol donar infeccions persistents. Passatges successius de les cèl·lules persistentment infectades permet incrementar la producció de virus [198], [201].

El mateix any en què Feinstone i els seus col·laboradors van visualitzar les partícules al microscopi electrònic [6], Provost i Hilleman van aconseguir aïllar en marmotes l'HAV provinent d'una biòpsia d'un pacient. Al cap de trenta-un passatges en aquest animal, van poder cultivar per primera vegada el virus *in*

*vitro*, utilitzant cultius primaris de fetge i posteriorment, en una línia cel·lular de ronyó de mono Rhesus (FRhK-6) [198]. Un any més tard, l'any 1974, Daemer i els seus col·laboradors van aconseguir aïllar l'HAV en cèl·lules AGMK directament dels excrements d'un pacient, sense replicar-lo prèviament en cap animal. El virus no produïa en cap de les dues línies cel·lulars efecte citopàtic [202], fet que va provocar que la seva detecció fos mitjançant tècniques indirectes (com el radioimmunoassaig, la immunofluorescència o la microscòpia electrònica) [199], [203], [204].

A partir de llavors diversos autors [204]–[208] han reportat l'aïllament i la propagació de l'HAV en varis sistemes cel·lulars, entre ells cultius cel·lulars de primats o no primats, així com també de cèl·lules hepàtiques o d'altres teixits cel·lulars. La propagació del virus en cèl·lules renals de simi com les CV-1, les BS-C-1 i les Vero (totes tres provinents de mono verd africà) o en les cèl·lules FRhK-4 i les FRhK-6 (provinents de mico Rhesus) ha sigut variable, però generalment subòptim. Això indica que la soca i passatge del virus, la línia cel·lular i la dosis infecciosa determinen les condicions òptimes de replicació viral [206]. Tanmateix, cal destacar que entre les cèl·lules de primats on el virus mostra una millor adaptació destaquen la línia cel·lular AGMK [209], i la línia cel·lular contínua FRhK-4 [210]. També, s'ha aconseguit multiplicar el virus en cèl·lules d'origen humà [198], com per exemple la línia cel·lular MRC-5 [211], provinent de teixit pulmonar i que és la utilitzada per a la producció de totes les vacunes inactivades en front a l'HAV que es comercialitzen actualment [212]. No obstant, en comparació amb altres picornavirus, la replicació de l'HAV en cultiu cel·lular segueix sent lenta i poc eficient, fent que sigui difícil arribar a produir grans quantitats d'antigen necessaris per tests de diagnòstic o vacunes [213], [214].

L'adaptació a cultiu cel·lular generalment condueix a certes mutacions en el genoma de l'HAV, localitzades principalment en les proteïnes no estructurals de la regió P2, en especial a les proteïnes 2B i 2C, i a la regió 5' no codificant [215], [216]. A més, aquesta adaptació ha provocat que les soques d'HAV produïdes siguin atenuades *in vivo*, disminuint la seva capacitat d'infecció als humans [8]. No obstant, algunes d'aquestes soques poden provocar un efecte citopàtic segons el cultiu cel·lular en el que repliquin [9], [217], [218], sent principalment present en les cèl·lules FRhK-4 i BS-C-1 (una línia contínua derivada de les cèl·lules AGMK). El cicle replicatiu d'aquestes soques adaptades és més curt i produeixen una major quantitat de virus respecte les no citopàtiques [9].

Tanmateix, per estudiar el cicle biològic de l'HAV *in vitro* és preferible utilitzar un model cel·lular més similar a les seves cèl·lules diana, els hepatòcits. Les línies d'hepatocarcinoma humà més utilitzades són HepG2 i Huh-7. Concretament, s'ha desenvolupat diversos clons de la línia cel·lular Huh-7 per millorar la propagació del virus en cultius cel·lulars d'hepatòcits. Un exemple són les cèl·lules Huh7-AI, una sublínia seleccionada a partir de la línia cel·lular Huh7 curades d'una infecció per HAV mitjançant el tractament amb interferó. Aquesta línia cel·lular és més permissiva i produeix un major nombre de partícules infeccioses en comparació amb la seva línia parental [219].



## **2. OBJECTIUS**





1. Estudiar el procés de sortida de dues poblacions (HM175-L0 i HM175-HP) del virus de l'hepatitis A: paper de les proteïnes cel·lulars RAB.
2. Avaluar el potencial de la població HM175-HP com a candidata vacunal.
3. Caracteritzar les propietats immunogèniques en ratolins BALB/C de partícules d'HAV quasi-embolcallades comparades amb partícules nues de les poblacions HM175-HP (HP) i el seu ancestre HM175-L0 (L0).
4. Caracteritzar les propietats immunogèniques en porcs *Landrace x Large white* de partícules d'HAV quasi-embolcallades comparades amb partícules nues de la població HM175-HP (HP).



**3. CAPÍTOL 1. Estudiar el procés de sortida de l'HAV: paper de les proteïnes cel·lulars RAB**



### 3.1 Antecedents

Clàssicament, l'HAV s'havia classificat com a virus nu, és a dir, no embolcallat. No obstant, s'ha descrit que el virus surt de la cèl·lula embolcallat amb una membrana que adquireix de la pròpia cèl·lula en absència de lisis cel·lular. Posteriorment, aquest embolcall es pot perdre per acció de les sals biliars donant lloc a partícules nues. Per aquesta raó, s'ha definit un doble fenotip de l'HAV: partícules nues (HAV) i partícules quasi-embolcallades (eHAV) [12], [13]. El descobriment d'aquest nou fenotip de l'HAV ha fet reconsiderar el seu model del cicle biològic.

Aquestes partícules quasi-embolcallades presenten una gran similitud amb exosomes. Mitjançant anàlisis proteòmics de partícules quasi-embolcallades purificades de sobrenedants de cèl·lules Huh-7.5, s'ha reportat que més del 90% de les proteïnes presents havien estat prèviament identificades en exosomes. Aquests resultats indiquen l'origen d'aquestes partícules quasi-embolcallades mitjançant un mecanisme de biogènesi similar al dels exosomes, el qual implica la secreció a través de la via dels MVBs [85], [220].

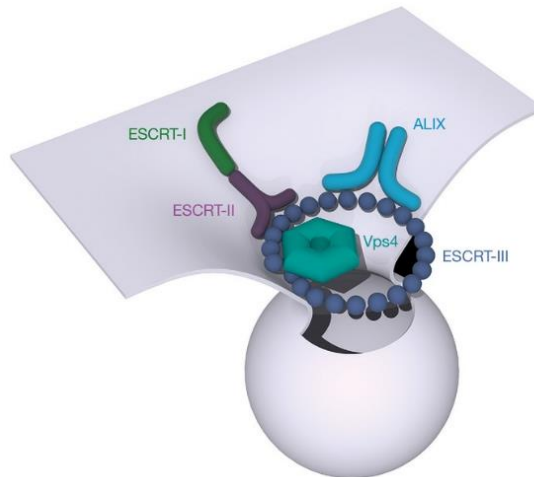
Les cèl·lules alliberen una gran varietat de vesícules extracel·lulars que són molt heterogènies en la seva mida, densitat i composició de proteïnes i àcids nucleics i a més, també difereixen en els seus mecanismes de biogènesi. Els exosomes són un subconjunt d'aquestes vesícules extracel·lulars amb un diàmetre de 40-100nm i d'origen endocític [85], [220]. Les proteïnes, metabòlits i àcid nucleics que alliberen juguen un paper important de comunicació intercel·lular participant en processos de resposta biològica [87].

La biogènesis dels exosomes comença amb la internalització de molècules via endocitosis. L'endosoma primerenc interacciona amb les proteïnes cel·lulars associades al complex ESCRT afavorint la formació de les vesícules intraluminals (ILV). Els endosomes tardans que contenen varies ILVs són anomenats MVB. Un cop formats els MVB el seu destí final pot ser fusionar-se amb els lisosomes, donant lloc a la degradació del seu contingut, o bé dirigir-se cap a la membrana plasmàtica, on la fusió de la membrana limitant dels MVBs i la membrana plasmàtica resulta en la secreció dels ILVs, i entre ells els exosomes. Aquestes dues possibles vies de degradació i secreció dels MVB estarien regulades per la homeòstasis cel·lular.

L'HAV podria seguir un mecanisme de biogènesis i sortida similar al dels exosomes per a la seva sortida de la cèl·lula. Les càpsides virals són reclutades i un cop als MVB, s'alliberen vesícules que porten càpsides de l'HAV al seu interior. Aquests exosomes que contenen HAV és el que s'ha definit com al fenotip quasi-embolcallat de l'HAV o eHAV [12], [28], [85], [86].

Les partícules d'eHAV contenen tetraespanina CD9, dipeptidil peptidasa 4 (DDP4), diferents proteïnes de la família de les chaperones (CHMP) i ALIX i sintenina, les quals interaccionen amb el complex ESCRT, concretament amb l'ESCRT-III (**Figura 9**). La funció principal de les proteïnes del complex ESCRT és l'escissió dels colls de membrana. A més, entre moltes altres funcions addicionals, destaquen els processos de gemmació i reclutament de proteïnes de membrana per al seu transport. Aquestes funcions addicionals les desenvolupen els complexos ESCRT-I i ESCRT-II, juntament amb la proteïna ALIX (*ALG-2-interacting protein X*) o també anomenada PDCD6IP, la qual és essencial per la biogènesis d'eHAV. També cal destacar el paper important de la proteïna VPS4 que és una ATPasa associada al complex ESCRT que proporciona

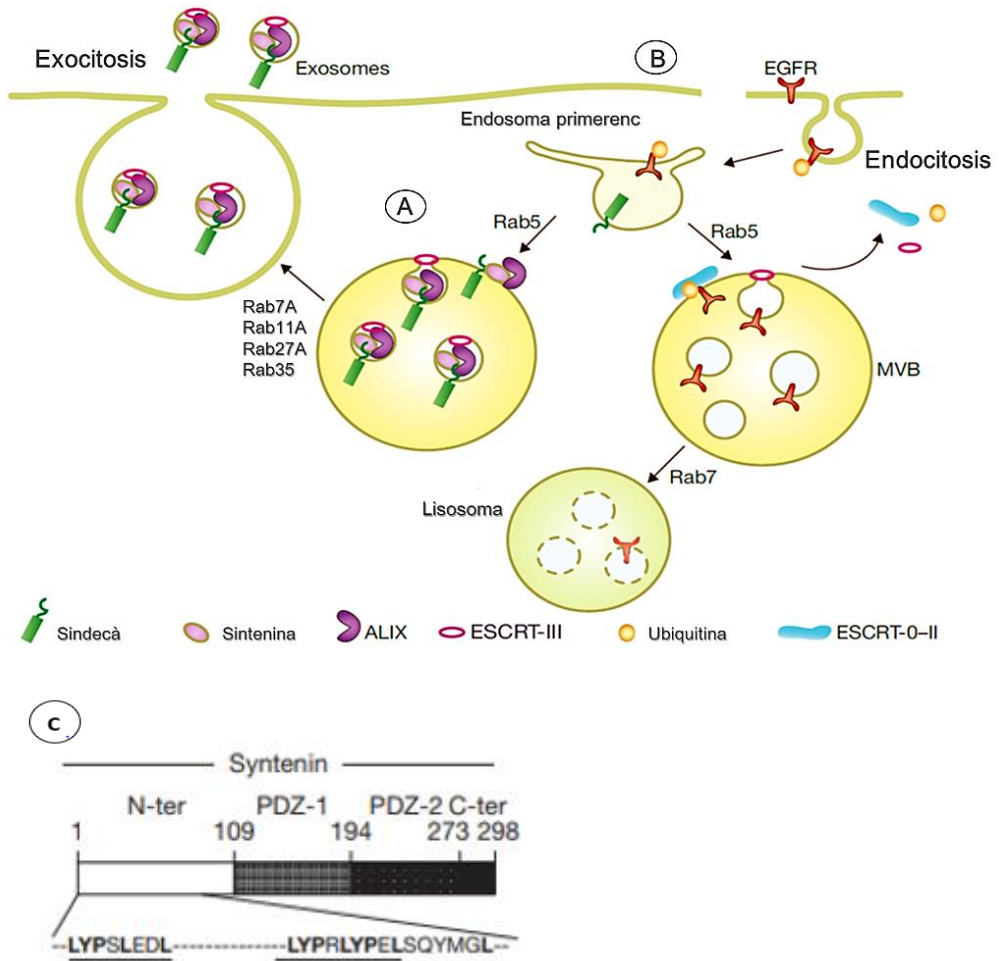
l'energia per al desensamblatge dels complexos ESCRT-III en la fissió de la membrana plasmàtica [85], [89], [221].



**Figura 9. Representació de les dues branques principals del complex ESCRT.** En la imatge es mostra la branca ESCRT-I/ESCRT-II i la branca ESCRTIII/ALIX del complex ESCRT en la formació d'una vesícula. Imatge adaptada de [221].

En la biogènesi de l'exosoma mediada per sindecà-ALIX (**Figura 10**), la cascada d'interaccions comporta la unió de la sintenina al domini citosòlic del sindecà i/o fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP2) a través dels seus dominis PDZ en tàndem, i la unió directa de la sintenina al domini V d'ALIX a través dels seus *late domains* LYPX(n)L en tàndem. A través d'aquestes unions es dona la internalització de membranes endosomals [222]–[225]. La proteïna ALIX pot existir com a monòmer o dímer, sent la forma dimèrica la forma activa d'ALIX [226]. Aquesta forma dimèrica permetria que ALIX sigui utilitzat com a pont per unir la sintenina amb les càpsides d'HAV.





**Figura 10. Biogènesis i secreció de les vesícules extracel·lulars mitjançant els cossos multivesiculars (MVBs).** A) Via sindecà-ALIX de biogènesis d'exosomes. La sintenina (lila) s'uneix al sindecà (verd fosc) i a ALIX (lila fosc) i posteriorment, ALIX recluta el complex ESCRT-III (rosa), conduint a la formació de vesícules intraluminals (ILV). Els cossos multivesiculars (MVBs) es fusionen amb la membrana plasmàtica i té lloc l'alliberació d'exosomes. B) Via clàssica de biogènesis d'exosomes. Receptors de superfície cel·lulars són ubiquitinatzats i endocitats. El complex ESCRT-0-II (blau) reconeix l'ubiquitina (taronja) i permet la formació d'ILV. Els MVBs que contenen aquests ILVs es fusionen amb els lisosomes on són degradats. Imatge adaptada de [227]. C) Representació esquemàtica de la sintenina. Els *late domains* están marcats en negreta. Imatge extreta de [223].

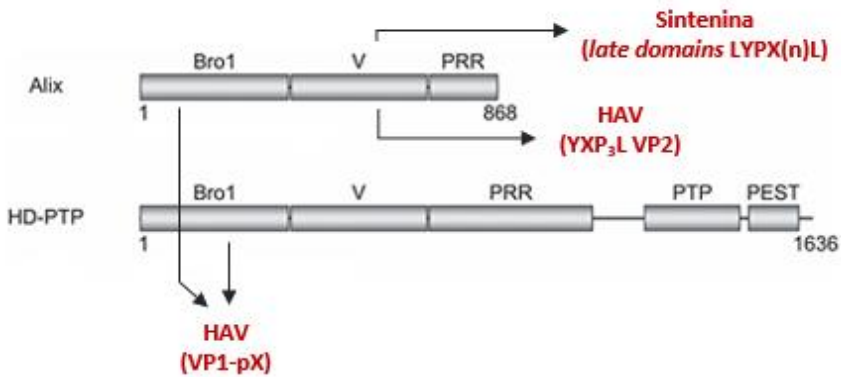
Les càpsides d'HAV es podrien reclutar com a *cargo* en els MVB mitjançant la interacció amb el domini V d'ALIX a través dels seus dos motius YPX<sub>3</sub>L

presentes a la proteïna VP2. Ambdós dominis conservats es troben a la proteïna VP2 separats per 28 aminoàcids. El primer d'ells està a la posició 144-149 (YPHGLL) i el segon a la posició 177-182 (YPVWEL) (**Figura 11**). En un model de rajos X de la càpsida madura s'ha observat que aquests motius estan enterrats i no són accessibles a la superfície, fet que semblaria incompatible amb la interacció amb ALIX. Malgrat això, s'han proposat diverses possibilitats d'interacció: 1) que aquests dominis enterrats sota la càpsida madura puguin tenir una major accessibilitat en la càpsida immadura que penetra dins els MVBs, 2) que la càpsida "respiri" i sigui transitòriament més accessible o 3) que hi hagi una segona senyal que interaccioni amb el complex [30], [225].



**Figura 11.** Late domains YPX3L localitzats a la proteïna VP2 de la càpsida l'HAV. Imatge adaptada de [17].

Adicionalment, la cristal·lografia ha mostrat que les partícules eHAV tenen una extensió a la proteïna VP1, anomenada domini pX o prèviament anomenat 2A (8kDa), la qual s'ha vist que és necessària per l'ensamblatge [12], [30]. En estudis d'estructura i interacció del domini pX s'ha observat que aquest domini juga un paper essencial direccionant l'HAV dins dels MVB i ALIX hi està involucrat [228] Recentment, s'ha descrit que la proteïna VP1-pX pot interaccionar amb els dominis Bro-1 presents a ALIX i al seu paràlog HD-PTP (*tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23*) (**Figura 12**), el qual també és una proteïna de domini Bro1 vinculada a direccionar *cargos* ubiquitinitzats cap als MVB. Aquest descobriment suggereix el paper de la proteïna VP1-pX en la invaginació i formació de la partícules eHAV [229].



**Figura 12.** Representació esquemàtica d'ALIX (a dalt) i HD-PTP (a baix). Les interaccions amb l'HAV estan indicades amb fletxes. Imatge adaptada de [230].

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, en el grup de Virus Entèrics s'ha seleccionat una població de replicació ràpida (HM175-HP) a partir de la soca HM175-L0 [231]. L'elevada replicació de la soca HP és degut a què té un IRES molt eficient juntament amb un ús de codons optimitzat en la regió VP1 de la càpsida. Tot i que els canvis d'ús de codons conduirien a canvis en el plegament de la càpsida, la població HP presenta unes característiques antigèniques i físiques similars a la població L0, sent reconeguda antigènicament pels anticossos policlonals. No obstant, mostra una reducció del 30% en el reconeixement per part d'anticossos monoclonals (mAbs, K34C8 i H7C27). Aquests fets suggereixen que els canvis de plegament amaguen parcialment els dos epítops reconeguts per aquests mAbs .

La càpsida de la població HM175-HP mostra només dos canvis no sinònims localitzats a les posicions 123 de la proteïna VP1 i 134 de la proteïna VP2 [61]. El primer d'ells es troba allunyat dels *late domains*, però la posició 134 de la VP2 es troba molt propera a la tirosina en posició 144 (4.5Å de distància), la qual és el primer residu d'un dels dos *late domains*. Aquesta mutació dona lloc a un canvi

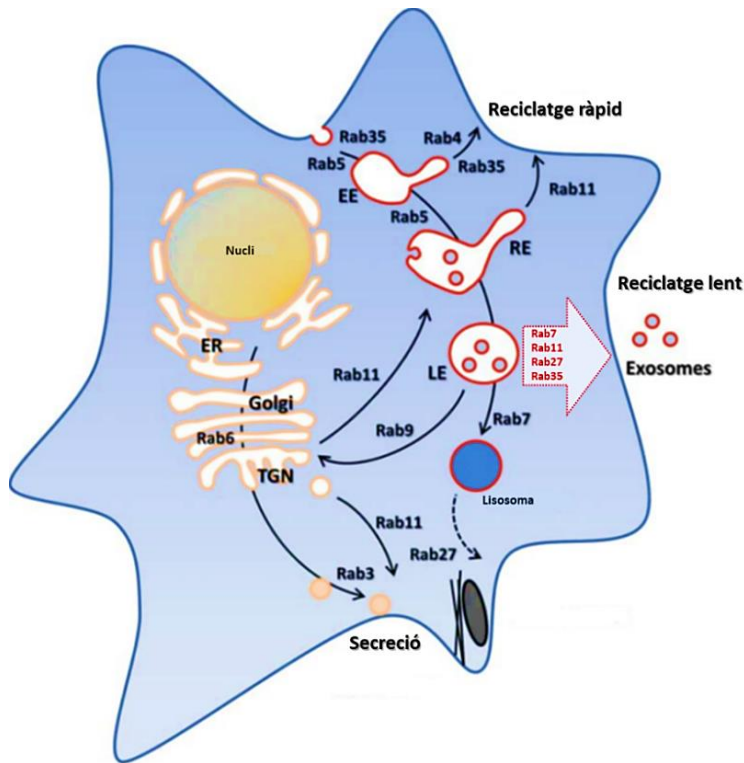
aminoacídic no conservatiu d'una serina (S) a una glicina (G). La glicina és un aminoàcid més flexible i potencialment podria donar més accessibilitat a la Tyr144, essencial per a la interacció del primer *late domain* 144-149 amb ALIX, facilitant la seva sortida a través dels MVB [61], [231].

Estudis anteriors en el grup de Virus Entèrics mitjançant microscòpia confocal han demostrat que la població HM175-HP té més afinitat per ALIX que la població HM175-L0. També, han pogut demostrar aquesta major afinitat en condicions de silenciament gènic d'ALIX. Aquests resultats poden suggerir que hi hauria dues possibles vies diferents de sortida del virus en funció del seu fenotip, l'eHAV alliberat a la sang a través de la membrana basolateral via ALIX o HD-PTP i els MVB, i els virions nus a la bilis a través de la membrana apical.

Per altra banda, les proteïnes RAB GTPases són la família de proteïnes més abundant de la superfamília de GTPases Ras. Les RAB GTPases són coordinadors essencials del trànsit de membrana i transport intracel·lular de vesícules [232], [233]. Cada una de les proteïnes està localitzada en un compartiment de membrana diferent, des d'on controla l'especificitat i direcció del transport de membrana endocític i exocític. Dit d'una altra manera, aquestes proteïnes són les responsables d'assegurar que els *cargos* siguin transportats al compartiment diana correcte [234].

Cal destacar el paper rellevant de les proteïnes RAB7, RAB11A, RAB27 i RAB35 en la rutes de trànsit endosomals (**Figura 13**). Concretament, RAB7 i RAB27 són més abundants als MVBs, mentre que RAB11 i RAB35 en les rutes de reciclatge lentes i ràpides, respectivament, les quals porten el *cargo* de retorn a la membrana plasmàtica [90]. En els últims anys, s'ha demostrat que alterar els nivells i/o activació de qualsevol d'aquests RAB, pot interferir en l'alliberament dels exosomes a l'espai extracel·lular. De fet, diferents estudis han demostrat

que la inhibició o silenciament de RAB7 [235], RAB11 [236], RAB27 [237] i RAB35 [238] afecta severament l'alliberació d'exosomes en alguns tipus cel·lulars, la qual cosa implica una acumulació intracel·lular de vesícules endosomals.



**Figura 13.** Representació il·lustrativa del trànsit vesicular regulat per les RAB GTPases. Imatge adaptada de [239]

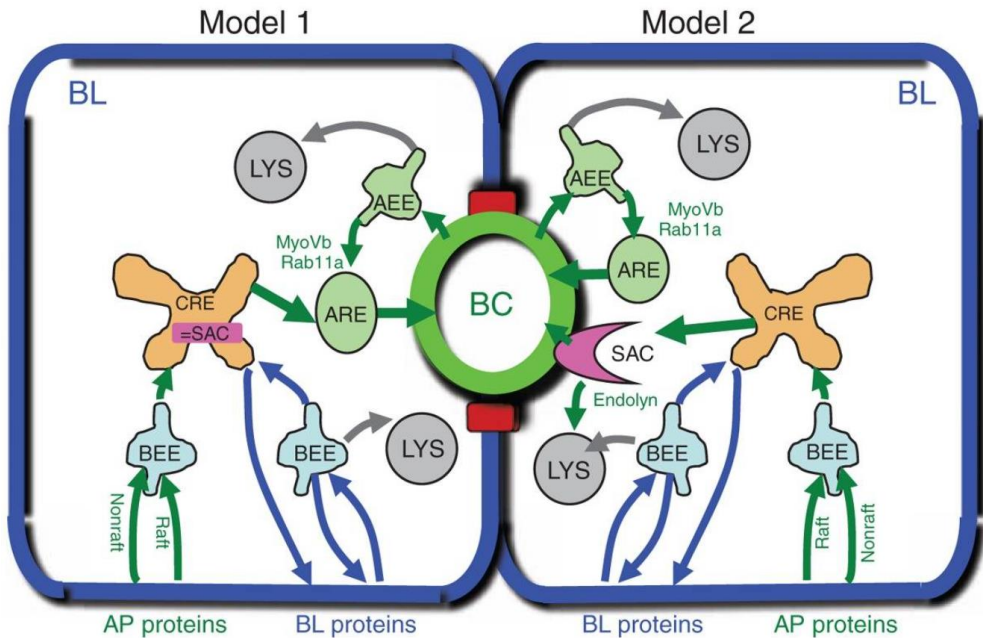
Alguns virus utilitzen els RAB mencionats per dur a terme diversos passos del seu cicle cel·lular. Per exemple, l'influenzavirus A (IAV), el virus Sendai (SeV), el virus respiratori sincicial (RSV) i l'Andes virus (ANDV) utilitzen RAB11A per facilitar el seu transport cap a la membrana apical [240]–[246].

També, s'ha reportat que RAB27 és utilitzat pel citomegalovirus humà (HCMV)[247], el virus de la immunodeficiència humana (HIV)[248] i el virus del herpes simple (HSV1)[249] pel transport entre la xarxa trans-golgi (TGN) i els endosomes. En el cas de l'HAV, de les quatre RAB GTPases mencionades, només s'ha trobat certa interacció del virus amb el RAB7A implicat en el transport dels endosomes primerencs als endosomes tardans en el procés d'entrada. Tot i així, no es coneix el paper de les proteïnes RAB en la sortida de l'HAV [59]. Aquest paper essencial del RAB7A també s'ha vist en l'HIV [250]. Això ens ha portat al present estudi sobre el paper de les RAB GTPases en la regulació de l'alliberament vectorial de l'HAV.

Les cèl·lules diana de l'HAV són els hepatòcits, els quals són cèl·lules multipolaritzades amb múltiples dominis apicals, laterals i basolaterals, fet que provoca que tinguin unes vies de trànsit molt complexes i especialitzades. Aquesta organització única dels hepatòcits els permet mantenir dos sistemes de flux a contracorrent: la síntesi i secreció de bilis i l'absorció, processament i secreció de components sanguinis sinusoidals. Cada cèl·lula té una extensa membrana basal permeable en contacte amb l'espai de Disse que possibilita l'intercanvi de sang que circula a través dels sinusoides hepàtics (**Figura 15A**). En canvi, el domini apical o canicular és més petit i serveix com a lloc de secreció d'àcids biliars cap al canalicle i posteriorment, cap als conductes biliars més grans fins a finalment arribar a l'intestí [251], [252]. Totes aquestes funcions dels hepatòcits es donen gràcies a què sempre es mantenen les unions estretes entre cèl·lules veïnes que permeten formar una barrera que separa les membranes apical i basolateral. D'aquesta manera s'aconsegueix impedir el contacte entre la sang i la bilis [253].

El trànsit intracel·lular entre els diferents compartiments dels hepatòcits és molt específic i complex i està regulat per proteïnes RAB. Per una banda, les

proteïnes residents a la membrana basolateral (BL) poden sotmetre's a un reciclatge ràpid directament dels endosomes primerencs basolaterals (BEE) o poden ser proteïnes apicals que mitjançant transcitosis són reciclades al compartiment de l'endosoma subapical (SAC) i d'aquí cap a la membrana BL (Figura 14).



**Figura 14. Vies de trànsit proposades per a les proteïnes apicals i basolaterals en hepatòcits.** Model 1: Un cop endocitades les proteïnes del canalicle biliar (BC) (fletxes verdes) van a parar a l'endosoma apical precoç (AEE) que posteriorment, poden dirigir-se cap a la via lisosomal (LYS) o cap a la via endosomal per ser reciclades a l'endosoma de reciclatge apical (ARE). Per altra banda, les proteïnes apicals que han arribat a la superfície basolateral (BL) poden arribar a l'endosoma subapical (SAC) a través dels endosomes primerencs basolaterals (BEE). Des del SAC poden dirigir-se cap a la superfície apical mitjançant ARE. Les proteïnes residents en BL (fletxes blaves) es sotmeten a un reciclatge ràpid a través de BEE o a través de SAC. Igual que AEE, BEE també pot dirigir les proteïnes cap al lisosoma. Model 2: es diferencia del model 1 en la definició de SAC i en l'itinerari de les proteïnes AP que pateixen transcitosis BL a AP, les quals arriben a la superfície AP a través de SAC després de ser reclutades per CRE. En aquest model, SAC també està implicat en la via lisosomal. Imatge adaptada de [251]

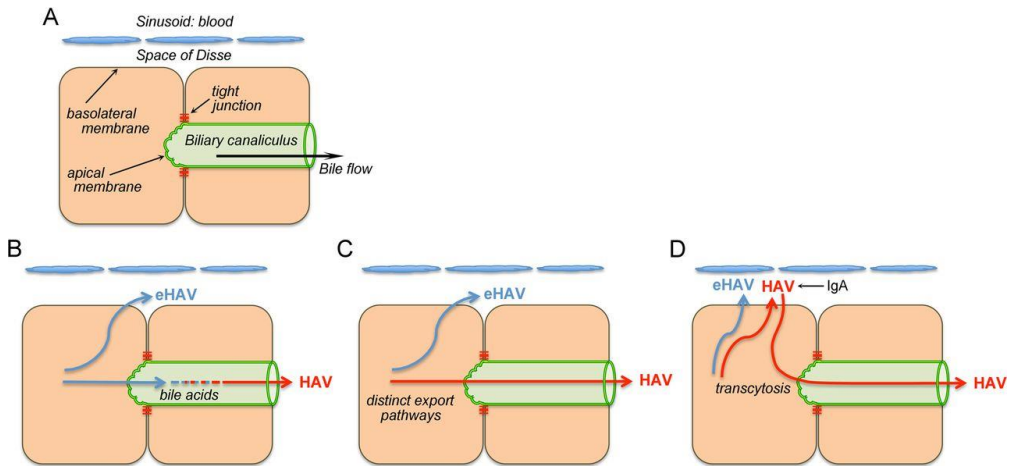
Per altra banda, les proteïnes residents a la membrana apical (AP) són endocitades en endosomes primerencs apicals (AEE) i van cap a l'endosoma de reciclatge apical (ARE), tornant altra cop cap a la membrana AP. A més, els compartiments BEE, SAC i AEE també poden reclutar proteïnes i dirigir-les cap al lisosoma per a la seva degradació [251].

L'HAV surt dels hepatòcits tant per les membranes basolaterals com per les apicals. Tanmateix, es desconeix si hi ha diferències en la via de trànsit entre la forma HAV i eHAV. S'ha intentat descriure un nou model del cicle biològic de l'HAV, però fins al moment, només ha estat demostrat que els virions quasi-embolcallats (eHAV) es troben circulant en la sang durant la infecció aguda, mentre que el fenotip nu (HAV) és el que s'elimina per la femta [12].

Existeixen diverses hipòtesis per explicar la circulació dels dos fenotips del virus, però cap d'elles ha sigut demostrada. La hipòtesis més simple suggereix que les partícules d'eHAV perdrien l'embolcall degut a l'acció dels àcids biliars sortint a través de la membrana apical (**Figura 15B**). Tanmateix, les concentracions d'àcids biliars necessàries per eliminar la membrana de l'eHAV han de ser molt elevades i la seva concentració dins dels aspirats de vesícula biliar humana tan sols arriba a nivells de 170-180nM [93], [253], fent que aquesta hipòtesis sigui controvertida. La hipòtesis alternativa proposa que les dues formes del virus podrien sortir de l'hepatòcit a través de vies d'exportació diferents. L'eHAV alliberat a la sang sortiria a través de la membrana basolateral mitjançant la via dels MVB i un cop a l'espai de Disse podria entrar als hepatòcits adjacents. En canvi, els virions nus presents en la bilis sortirien a través de la membrana apical via els lisosomes (**Figura 15C**) [93]. Aquesta hipòtesis semblaria vàlida ja que diversos estudis previs [46], [92], [93] mostren com l'HAV s'allibera de forma vectorial a partir de cultius de cèl·lules epitelials especialitzades. Tot i que aquests estudis no diferencien entre virus nus i quasi-



embolcallats, deixant oberta la possibilitat d'una alliberació diferencial del virus quasi-embolcallat front al nu.



**Figura 15.** Microanatomia de l'hepatòcit i les tres possibles hipòtesis per a l'exportació de les dues formes de l'HAV en sang (eHAV) i en femta ( HAV). Imatge obtinguda de [93].

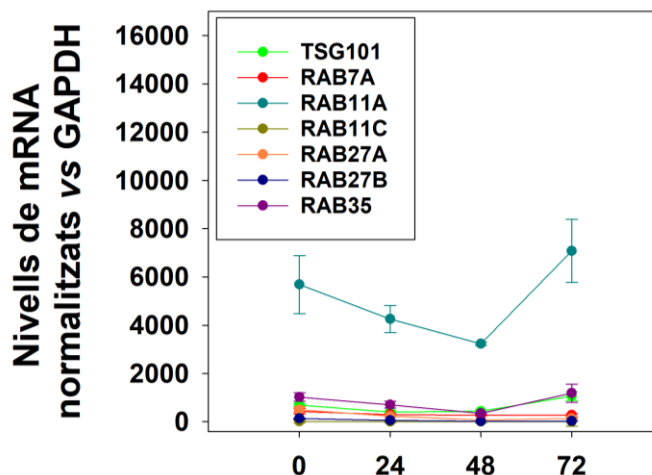
La tercera i última hipòtesis proposada suggereix que tant els virions quasi-embolcallats com els nus s'alliberen a través de la membrana basolateral a l'espai de Disse. Posteriorment, aquests virions nus entren altra vegada als hepatòcits mitjançant un procés de transcitosis i arriben a la membrana apical, on són alliberats al tracte biliar (**Figura 15D**). Tot i que els virus transportats per transcitosis representen un percentatge molt petit dels virus excretats en femta, aquesta transcitosis es pot veure potenciada en presència d'anticossos IgA que s'uneixen a la càpsida de l'HAV [254]. Aquesta ruta d'exportació apical proposada sembla complicada, però imita la ruta utilitzada pel transport de proteïnes apicals dins dels hepatòcits (**Figura 14**). Aquesta via demostraria altra vegada que els virus són capaços d'explotar la maquinària cel·lular per millorar la seva transmissió [93], [254]. De totes aquestes possibilitats de circulació dels dos fenotips d'HAV, la hipòtesis més acceptada és la segona.

## 3.2 Resultats

### 3.2.1 Expressió de diferents gens codificants de proteïnes RAB

L'expressió de gens codificants de proteïnes RAB es va analitzar en cèl·lules Huh7-AI que són hepatòcits derivats d'hepatocarcinoma humà. Es va mesurar l'expressió en diferents gens RAB (RAB7, RAB11A, RAB11C, RAB27A, RAB27B i RAB35) involucrats en la secreció d'exosomes, i també del gen supressor de tumors 101 (TSG101), el qual es un component de l'ESCRT-I que no es troba present a eHAV i per tant, ens va servir com a control. L'expressió gènica va ser mesurada a través dels nivells de mRNA durant 72h.

Els nivells de mRNA de RAB11A van ser molt més alts que la resta (**Figura 16**), seguit del RAB35. Aquests resultats suggereixen que RAB11A i RAB35 podrien regular el trànsit en els hepatòcits.

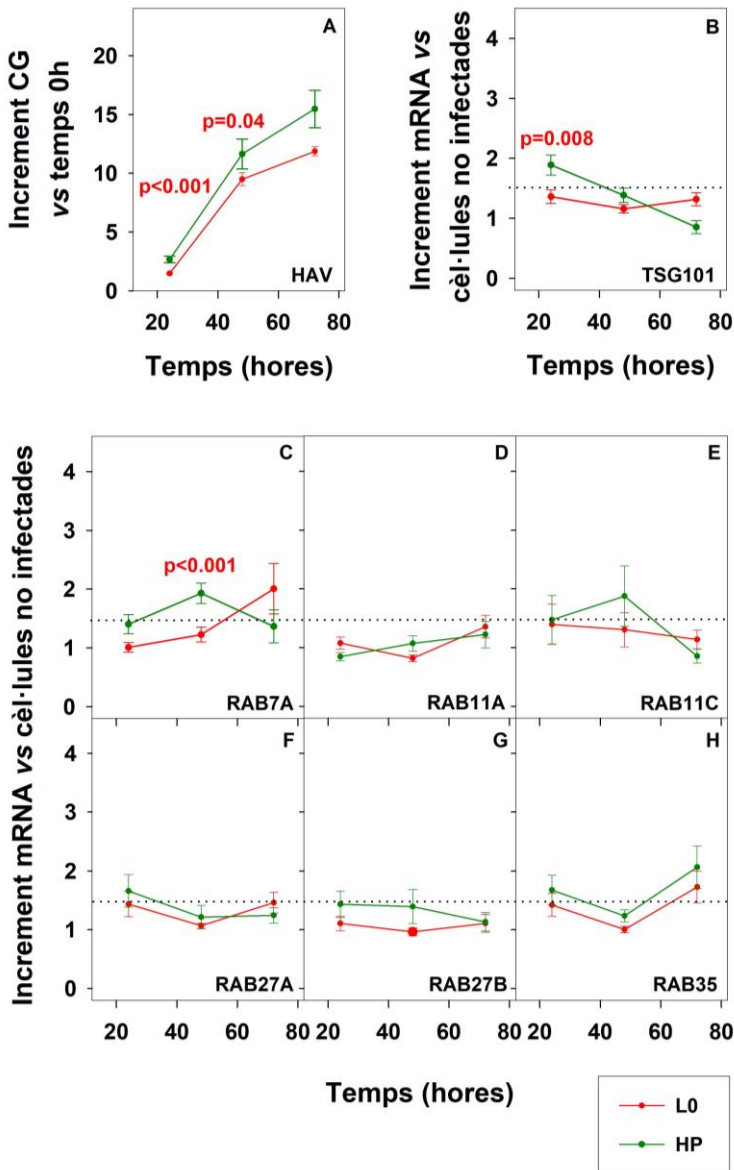


**Figura 16.** Expressió gènica de proteïnes RAB. Les dades estan representades com la mitjana  $\pm$  error estàndard.

### 3.2.2 Expressió de diferents gens codificants de proteïnes RAB en cèl·lules Huh7-AI infectades amb HAV

Per tal d'esbrinar si el patró d'expressió dels gens RAB en cèl·lules Huh7-AI varia durant el cicle infecció d'HAV, es van infectar aquestes cèl·lules amb les dues poblacions d'HAV, L0 i HP, utilitzant una MOI de 5, tal i com es detalla en l'apartat 7.1.6.

La replicació vírica va ser confirmada quantificant el número de còpies genòmiques (CG) en el sobrenedant de cèl·lules infectades a les 0, 24, 48 i 72h p.i, seguint el protocol de l'apartat 7.2. L'increment de les CG de la població HP va ser significativament més alt comparat amb el de la població L0, confirmant la seva major taxa de replicació (**Figura 17A**). Simultàniament, es van mesurar els nivells de mRNA dels diferents RAB analitzats i la proteïna TSG101 en cèl·lules infectades amb HAV vs cèl·lules no infectades, tal i com es detalla en l'apartat 7.3. Es va establir un increment mínim d'1.5 vegades com a nivell de tall per definir una pujada dels nivells de mRNA específica. Només la infecció amb la població HP es va associar a un augment de 1.89X de l'expressió gènica del TSG101 a les 24 h p.i, però no a les 48 i 72 h p.i (**Figura 17B**). Tenint en compte els baixos nivells d'expressió en cèl·lules no-infectades (**Figura 16**), podem assumir que la seva expressió en cèl·lules infectades és força baixa. Els nivells de mRNA per RAB7A (**Figura 17C**) i RAB35 (**Figura 17H**) van ser més alts en cèl·lules infectades respecte a les no infectades, especialment en cèl·lules infectades amb la població HP. Contràriament, els nivells de mRNA per RAB11A, RAB11C, RAB27A i RAB27B no es van veure incrementats en cèl·lules infectades. No obstant, cal tenir en compte que els nivells d'expressió de RAB11A probablement no van augmentar a causa del seu alt nivell basal en cèl·lules no infectades (**Figura 16**).



**Figura 17. Efecte de la replicació d'HAV en l'expressió gènica de proteïnes RAB en la línia cel·lular Huh7-AI.** A) Increment de les còpies genòmiques (CG) al llarg del temps en cèl·lules infectades amb les poblacions L0 i HP d'HAV. B) Increment del mRNA de TSG101 al llarg del temps en cèl·lules infectades amb HAV. C) Els mateixos paràmetres per RAB7A. D) Els mateixos paràmetres per RAB11A. E) Els mateixos paràmetres per RAB11C. F) Els mateixos paràmetres per RAB27A. G) Els mateixos paràmetres per RAB27B. H) Els mateixos paràmetres per RAB35. Línies vermelles i verdes fan referència a cèl·lules infectades amb L0 i HP, respectivament. La línia discontinua representa el nivell de tall establert a un increment de 1.5. Les dades estan representades com la mitjana  $\pm$  error estàndard. Hi ha diferències estadísticament significatives entre les dues poblacions quan la  $p \leq 0.05$ .

El conjunt de tots aquests resultats suggereix que les proteïnes RAB7A i RAB35, i potser RAB11A, podrien estar involucrades en la via de secreció d'eHAV. Les dues primeres per augmentar l'expressió durant la infecció d'HAV respecte a les cèl·lules no infectades i la última per tenir una expressió molt elevada en les cèl·lules Huh7-AI. Tot això ens porta a l'estudi del paper d'aquestes proteïnes RAB en la secreció d'eHAV.

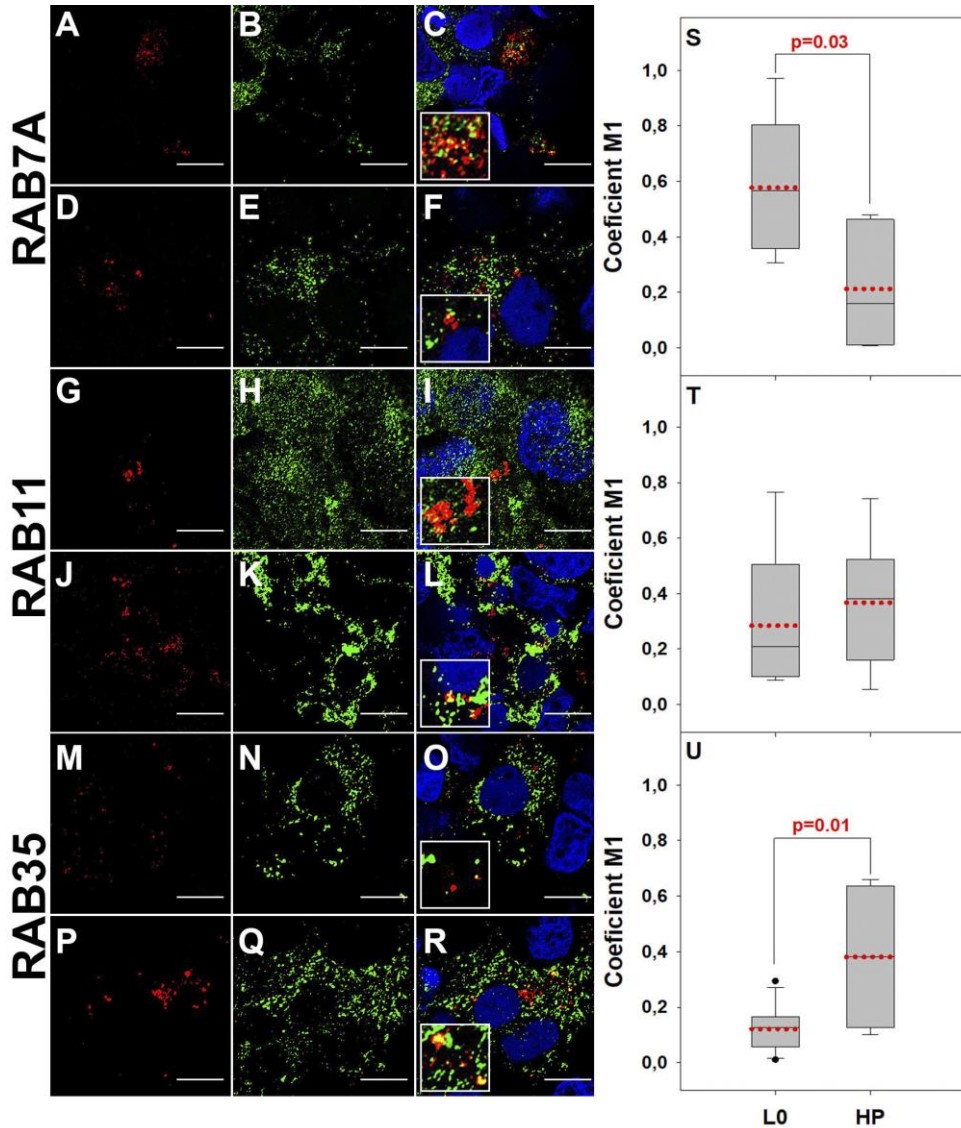
### **3.2.3 Colocalització de les proteïnes RAB i HAV en cèl·lules Huh7-AI no polaritzades**

Aquest estudi es va fer mitjançant un anàlisi quantitatiu de colocalització per microscòpia confocal de les càpsides del virus amb les diferents proteïnes RAB. Es va posar a punt una immunofluorescència indirecta de doble marcatge en cultius de cèl·lules Huh7-AI no polaritzades a les 48 h p.i. Aquest temps post-infecció es va establir valorant el nivell de replicació tan de la població parental L0 com de la HP en aquesta línia cel·lular, i tenint en compte que es vol estudiar el paper de les proteïnes RAB en les fases finals del cicle replicatiu de l'HAV.

Per dur a terme aquest estudi, es van infectar monocapes de cèl·lules Huh7-AI no polaritzades i confluents amb les dues poblacions del virus amb una MOI de 5. Posteriorment, es va realitzar el protocol detallat a l'apartat 7.4. Per aquest anàlisi es van realitzar un mínim de tres experiments independents amb dues rèpliques per cadascuna de les proteïnes RAB i població viral, escanejant tots els camps microscòpics i posteriorment, fent el seu anàlisi qualitatiu mitjançant l'observació d'imatges. Es van establir uns paràmetres fixes per a la presa d'imatges i per al seu posterior anàlisi quantitatiu (veure apartat 7.4.1 de materials i mètodes). Simultàniament, es va fer també un anàlisi quantitatiu mitjançant el càlcul dels coeficients de colocalització.

L'observació de les imatges permet afirmar que les càpsides de L0 (canal verd) colocalitzen clarament amb RAB7A (canal vermell)(**Figura 18C**), ja que es pot veure la coincidència en l'espai del marcatge verd i el vermell formant punts entre groc i taronja. En canvi, no colocalitzen tant amb RAB11A (**Figura 18I**) i pràcticament no hi ha colocalització amb RAB35 (**Figura 18O**). Contràriament, les càpsides de HP clarament colocalitzen amb RAB35 (**Figura 18R**) i RAB11 (**Figura 18L**) i gairebé gens amb RAB7A (**Figura 18F**). Aquests resultats suggereixen que les poblacions L0 i HP podrien estar utilitzant RAB11 i preferentment les proteïnes RAB7A i RAB35, respectivament, per la sortida de les partícules quasi-embolcallades.

L'anàlisi quantitatiu va corroborar aquestes observacions. Mitjançant la deconvolució de totes les imatges extretes, es va quantificar la colocalització amb els coeficients de Manders M1 (percentatge de la càpsida del virus que colocalitza amb la proteïna RAB). Amb els resultats obtinguts es confirma que hi ha una major colocalització entre les càpsides de L0 i la proteïna RAB7A que amb les càpsides d'HP (**Figura 18S**), on la mitjana dels coeficients de Manders M1 és de 0.58 (58% de colocalització) i 0.21 (21% de colocalització), respectivament. En canvi, les càpsides d'HP colocalitzen molt més amb la proteïna RAB35 que les càpsides de L0 (**Figura 18U**), on les mitjanes són de 0.38 i 0.13, respectivament. Pel que fa a RAB11A, es va detectar una colocalització similar amb les càpsides de L0 i HP (**Figura 18T**), on les mitjanes de colocalització són de 0.29 i 0.37, respectivament.



**Figura 18. Colocalització de càpsides d'HAV amb proteïnes RAB en cèl·lules Huh7-AI no polaritzades.** **A-C)** Co-localització de càpsides d'HAV amb RAB7A, en cèl·lules infectades amb la població L0 a les 48 hores post-infecció (h p.i). **D-F)** Mostren el mateix anàlisi per cèl·lules infectades amb la població HP. **G-I)** Mostren el mateix anàlisi pel RAB11 amb cèl·lules infectades amb L0. **J-L)** Mostren el mateix anàlisi pel RAB11 amb cèl·lules infectades amb HP. **M-O)** Mostren el mateix anàlisi pel RAB35 amb cèl·lules infectades amb L0. **P-R)** Mostren el mateix anàlisi pel RAB35 amb cèl·lules infectades amb HP. En vermell (HAV), en verd (RAB) i de taronja a groc (colocalització entre HAV i RAB). La reconstrucció de les imatges és adquirida a partir de seccions seriades de  $0,12\mu\text{m}$  i les barres blanques corresponen a  $10\mu\text{m}$ . **S-U)** Anàlisi de microscopia confocal quantitativa de la proporció de càpsides d'HAV colocalitzant amb RAB7A (S), RAB11A (T) i RAB35 (U). Hi ha diferències estadísticament significatives entre les dues poblacions quan la  $p \leq 0.05$ .

### 3.2.4 Silenciament dels gens RAB

Per corroborar que les proteïnes RAB estudiades tenen un paper en la sortida de l'HAV, es varen avaluar les conseqüències del seu silenciament gènic.

Aquest estudi es va realitzar sembrant cèl·lules Huh7-AI en plaques de 24 pous i un cop arribades a la confluència, es transfectaven amb un mix de seqüències siRNA que tenen com a diana específica cada un dels gens RAB a analitzar. El silenciament es va fer individualment per cada un d'ells o doble combinant els mix de siRNA. Posteriorment, es recollien els sobrenedants i lisats cel·lulars per mirar l'efecte de cadascun dels silenciaments realitzats. Els resultats esperables quan un RAB està implicat en la sortida és observar una caiguda del títol a sobrenedant i un increment de les còpies genòmiques intracel·lulars. Per aquest estudi es van dur a terme dos experiments amb tres rèpliques per cada gen i població d'HAV.

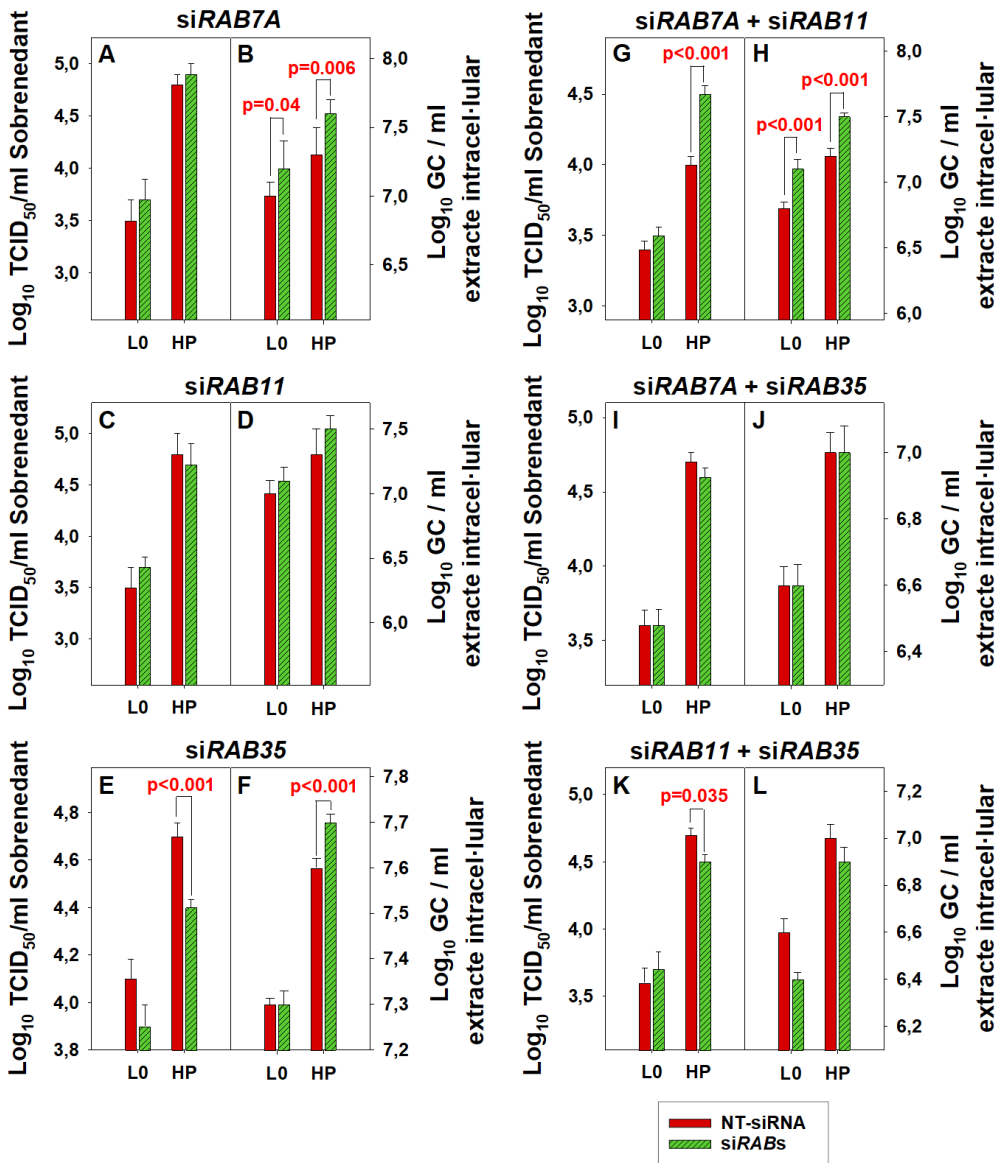
Abans d'analitzar les conseqüències del silenciament, ens vam assegurar que el silenciament assolit fos suficient per poder treure'n conclusions fiables. El silenciament gènic individual va ser en mitjana de  $97.74\% \pm 0.63\%$ ,  $88.51\% \pm 2.08\%$  i  $67.96\% \pm 3.94\%$  per RAB7A, RAB11A i RAB35, respectivament. Al ser tots superiors al 60%, vam considerar que eren silenciaments suficients per veure si provocaven algun efecte en la cèl·lula.

El silenciament individual de RAB7A (**Figura 19A i B**) i RAB11A (**Figura 19C i D**) no indueixen una reducció de la sortida de partícules infeccioses ni per la soca L0 ni per la soca HP (**Figura 19A i C**). No obstant, curiosament hi ha un increment significatiu dels genomes intracel·lulars amb el silenciament del RAB7A (**Figura 19B**) mentre que aquest efecte no es veu amb el silenciament de RAB11A (**Figura 19D**). Aquest increment podria estar relacionat amb la



reducció del trànsit cap al lisosoma promogut per RAB7A. Pel que fa al silenciament individual de RAB35, aquest provoca una reducció significativa dels títols infecciosos al sobrenedant de cèl·lules infectades amb HP (**Figura 19E**) concordant amb un increment significatiu de les còpies genòmiques intracel·lulars (**Figura 19F**). Aquests canvis no es veuen en la població L0. Els resultats indicarien que RAB35 semblaria tenir una implicació en la sortida viral de la població HP. De fet, aquesta teoria podria estar relacionada amb el fet que la població HP té un cicle de replicació més ràpid que el de la població L0 i que la proteïna RAB35 està implicada en la via ràpida del trànsit vesicular, tal i com s'ha comentat en els antecedents [239].

En quant als resultats del silenciament gènic doble, la caiguda dels nivells de mRNA va ser en mitjana de  $96\% \pm 1.36$  i  $74.36\% \pm 3.36$  per RAB7A i RAB11A, respectivament,  $94.3\% \pm 1.91$  i  $44.15\% \pm 6.35$  per RAB7A i RAB35, respectivament i  $83.19\% \pm 2.66$  i  $60.37\% \pm 6.82$  per RAB11A i RAB35, respectivament. Igual que en el cas del silenciament individual, al ser totes les caigudes superiors al 60%, excepte pel RAB35 en el doble silenciament amb RAB7A, vam considerar que eren silenciaments suficients per veure si provocaven algun efecte en la cèl·lula.



**Figura 19. Efecte del silenciament dels gens RAB en l'alliberament d'HAV de les cèl·lules Huh7-AI infectades. A)** Efecte del silenciament de RAB7A a la sortida d'HAV cap al sobrenedant. **B)** Efecte del silenciament de RAB7A en les còpies genòmiques intracel·lulars. **C-D)** Mostren el mateix efecte silenciament RAB11A. **E-F)** Mostren el mateix efecte silenciament alhora RAB7A i RAB11A. **I-J)** Mostren el mateix efecte silenciament alhora RAB7A i RAB35A. **K-L)** Mostren el mateix efecte silenciament alhora RAB11A i RAB35. Els títols vírics en el sobrenedant estan expressats com el Log<sub>10</sub> del TCID<sub>50</sub>/ml i les còpies genòmiques intracel·lulars estan expressades com el Log<sub>10</sub> per ml d'extractes cel·lulars. Hi ha diferències estadísticament significatives entre les dues poblacions quan la  $p \leq 0.05$ .

El doble silenciament de RAB7A i RAB11A s'associa a un increment significatiu de les còpies genòmiques intracel·lulars per ambdues soques d'HAV (**Figura 19H**). Això podria estar relacionat amb una baixa degradació del virus en el lisosoma degut al silenciament de RAB7A, tal i com hem comentat anteriorment. Sorprenentment, l'alliberament de partícules infeccioses al sobrenedant només incrementa significativament en el cas de cèl·lules infectades amb HP. Aquests resultats podrien estar relacionats amb un augment estadísticament significatiu de 1,99X dels nivells de mRNA de RAB35 observats en cèl·lules infectades amb HP amb aquest doble silenciament. Tot plegat, el doble silenciament de RAB7A i RAB11A indica una producció de virus més elevada en aquestes condicions, traduint-se en un increment del virus en el sobrenedant, només significatiu en el cas de la soca HP, la qual és capaç d'utilitzar el RAB35 per la seva sortida. També, aquests resultats estarien suggerint que L0 no utilitza RAB35 per la seva sortida.

En el doble silenciament de RAB7A i RAB35 no indueix cap canvi rellevant, ni per la soca HP (**Figura 19I-J**). Això podria estar explicat per el baix nivell de silenciament aconseguït de RAB35, provocant que no es vegin bé els efectes del silenciament, i/o una reducció de trànsit cap al lisosoma. Finalment, el doble silenciament de RAB11A i RAB35 causa una caiguda significativa dels títols infecciosos en el sobrenedant de cèl·lules infectades amb HP (**Figura 19K**), però no es correlaciona amb un augment de les còpies genòmiques intracel·lulars (**Figura 19L**). Aquest fet podria estar explicat per l'increment estadísticament significatiu de 8.2X del mRNA de RAB7A en aquestes condicions i la seva associació amb el trànsit cap al lisosoma. Aquest doble silenciament no mostra cap efecte rellevant en cèl·lules infectades amb la població L0.

Simultàniament, es va analitzar l'efecte del silenciament mesurant els *fold changes* entre cèl·lules silenciades i no silenciades en cada condició. Aquestes dades ens van aportar informació rellevant que no havíem pogut observar en l'anàlisi anterior.

Breument, per la població HP, els increments en *fold changes* de les CG intracel·lulars són significativament més alts que les reduccions en *fold changes* dels virus alliberats al sobrenedant amb cada silenciament individual (**Taula 3**). Aquesta observació suggereix que totes les proteïnes RAB poden estar involucrades en la sortida d'HP. A més, corrobora la relació entre la població HP i RAB35 que havíem detectat prèviament (**Figura 19E-F**).

Per altra banda, tot i que malauradament encara no hem vist un indicatiu clar de quin RAB podria ser utilitzat per l'alliberament de la soca L0, mirant els *fold changes* de cada condició ens fa entreveure quina proteïna RAB pot estar controlant la seva sortida. Fixant-nos en el *fold change* intracel·lular vs sobrenedant del doble silenciament de RAB7A i RAB11A, s'observa que és de  $2.53 \pm 0.11$  vs  $1.67 \pm 0.14$ , respectivament (**Taula 3**). Aquesta diferència podria explicar-se per l'acumulació intracel·lular del virus al trobar-se la via de degradació cap al lisosoma disminuïda i també, per veure's afectada la seva sortida degut al silenciament. Per tant, aquests resultats ens indicarien de manera indirecta que la població L0 podria estar utilitzant RAB7A i RAB11A per sortir de la cèl·lula infectada. També, si mirem el *fold change* del doble silenciament de RAB11A i RAB35, s'observa que el *fold change* extracel·lular és significativament més alt que el *fold change* de les CG intracel·lulars ( $2.09 \pm 0.44$  vs  $0.85 \pm 0.05$   $p=0.05$ ; **Taula 3**), possiblement degut a què en aquestes condicions l'expressió de RAB7A té un increment estadísticament significatiu de 7.58X. Aquests resultats suggereixen també un cert paper de RAB7A en accelerar la sortida de la població L0.

Conjuntament, aquests resultats condueixen a pensar que la soca HP utilitza la xarxa de trànsit controlada per RAB35, i en menor mesura RAB11A i RAB7A, per a la seva sortida de la cèl·lula. En canvi, la soca L0 utilitzaria preferentment la xarxa de trànsit controlada per RAB7A, i en menor mesura RAB11A.

**Taula 3. Efecte del silenciament dels gens RAB en l'alliberament de virus en el sobrenedant i en l'acumulació de virus intracel·lulars en cèl·lules Huh7-A1 infectades amb soques L0 i HP.** Els virus del sobrenedant es van mesurar com a unitats infeccioses, mentre que els virus intracel·lulars es van mesurar com a còpies genòmiques. L'efecte del silenciament s'expressa en fold changes.

Silenciament gènic		RAB7	RAB11	RAB35	RAB7 / RAB11	RAB7 / RAB35	RAB11 / RAB35
Fold change de TCID <sub>50</sub> <sup>1</sup>	L0	2.31±0.31	1.55±0.23	0.93±0.15	1.67±0.14	1.71±0.31	2.09±0.44
	HP	1.31±0.08	0.93±0.31	0.51±0.03	4.31±0.35	1.00±0.10	0.74±0.06
	p-valor	p>0.05	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p=0.007</b>	<b>p&lt;0.001</b>	p>0.05	<b>p=0.02</b>
Fold change de GC <sup>2</sup>	L0	1.77±0.26	1.29±0.06	1.11±0.03	2.53±0.11	0.99±0.03	0.85±0.05
	HP	1.95±0.23	1.44±0.11	1.31±0.04	2.17±0.11	0.95±0.04	0.88±0.04
	p-valor	<b>p&lt;0.001</b>	p>0.05	<b>p&lt;0.001</b>	p>0.05	p>0.05	p>0.05
L0	Fold change de TCID <sub>50</sub> <sup>1</sup>	2.31±0.31	1.55±0.23	0.93±0.15	1.67±0.14	1.71±0.31	2.09±0.44
	Fold change de GC <sup>2</sup>	1.77±0.26	1.29±0.06	1.11±0.03	2.53±0.11	0.99±0.03	0.85±0.05
	p-valor	p>0.05	p>0.05	p>0.05	<b>p&lt;0.001</b>	p>0.05	<b>p=0.05</b>
HP	Fold change de TCID <sub>50</sub> <sup>1</sup>	1.31±0.08	0.93±0.31	0.51±0.03	4.31±0.35	1.00±0.10	0.74±0.06
	Fold change de GC <sup>2</sup>	1.95±0.23	1.44±0.11	1.31±0.04	2.17±0.11	0.95±0.04	0.88±0.04
	p-valor	<b>p=0.03</b>	<b>p=0.02</b>	<b>p&lt;0.001</b>	<b>p&lt;0.001</b>	p>0.05	p>0.05

<sup>1</sup> Mitjana i error estàndard del fold change de la dosi infecciosa de cultiu de teixit (TCID<sub>50</sub>/ml) en el sobrenedant.

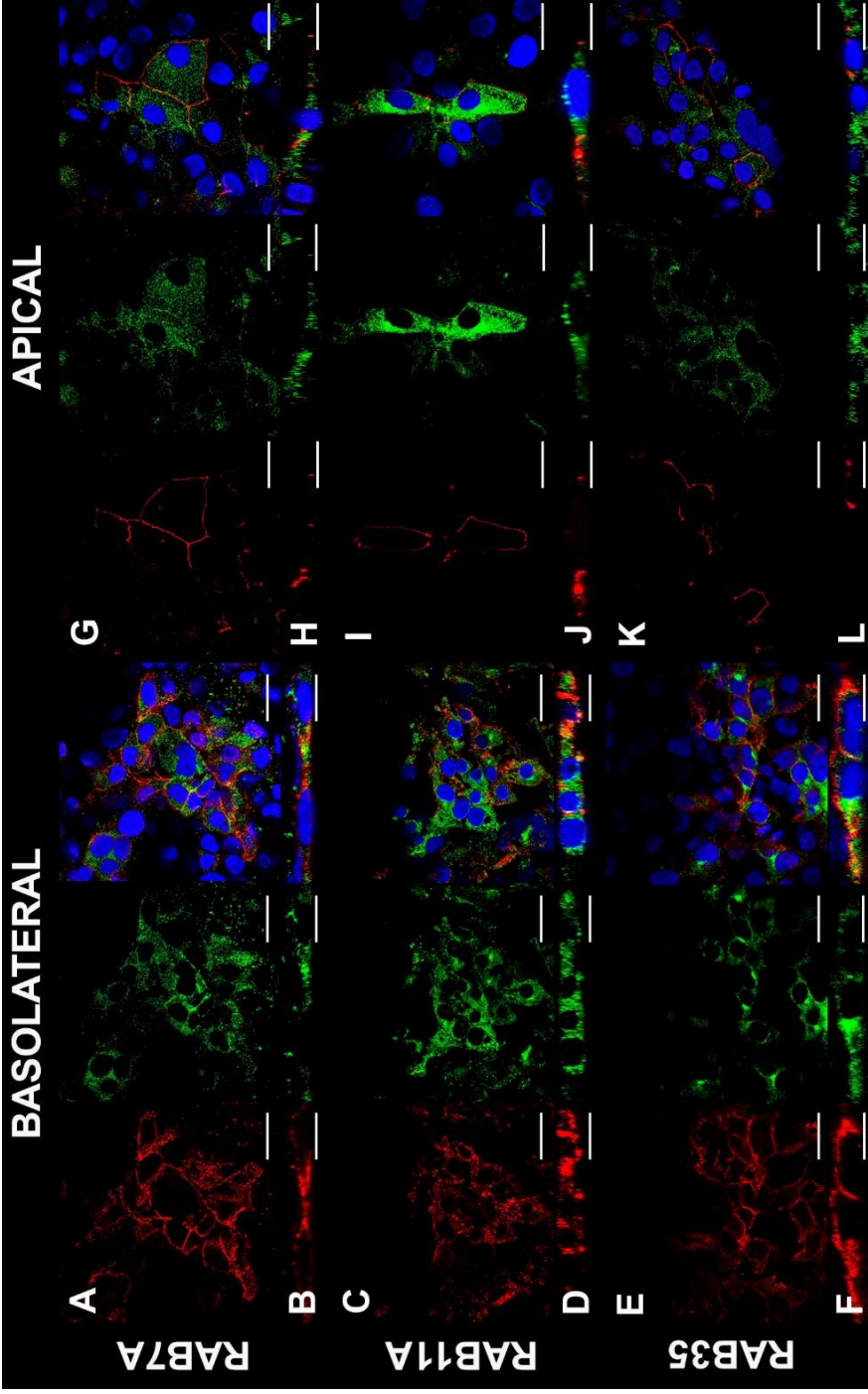
<sup>2</sup> Mitjana i error estàndard del fold change de les còpies genòmiques (GC/ml) intracel·lulars.

### 3.2.5 Colocalització de les proteïnes RAB i HAV en cèl·lules Huh7-AI polaritzades

Donat el diferent ús de les diferents proteïnes RAB per part de les dues soques d'HAV, ens vam plantejar si podien tenir una eficiència de sortida diferent per les membranes basolateral (BL) i apical (AP). Per tant, es va creure oportú estudiar la distribució de les proteïnes RAB en les membranes basolaterals i apicals en cèl·lules Huh7-AI polaritzades, la qual cosa podria explicar la secreció vectorial d'HAV en els hepatòcits.

Per dur a terme aquest estudi, es van polaritzar cèl·lules Huh7-AI durant 14 dies en presència de DMSO, tal i com es detalla en l'apartat 7.6. Posteriorment, les monocapes polaritzades van ser tenyides amb anticossos dirigits específicament contra marcadors de les unions estretes de la membrana apical (zònula ocludens, ZO-01) i basolateral (*alpha 1 Sodium Potassium ATPase*, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase). Amb l'objectiu d'examinar la colocalització de cada RAB amb els marcadors de membrana, es van realitzar un mínim de tres experiments independents i cinc captures representatives per a cada experiment i anàlisi de colocalització. Posteriorment, igual que es va fer en l'apartat 4.2.3, es va analitzar les imatges qualitativament mitjançant l'observació d'imatges i quantitativament mitjançant els coeficients de Manders M1 (percentatge de la membrana que colocalitza amb la proteïna RAB) i M2 (percentatge de proteïna RAB que colocalitza amb la membrana).

L'anàlisi qualitatiu ens permet examinar les imatges des d'un pla transversal i un pla sagital, la qual cosa ens facilita observar molt millor les colocalitzacions. En les imatges es mostra que els marcadors de RAB7A, RAB11A i RAB35 estan distribuïts tant al llarg de la membrana BL (**Figura 20A-F**) com de l'AP (**Figura 19G-L**) i no ens permet veure diferències clares entre ells.

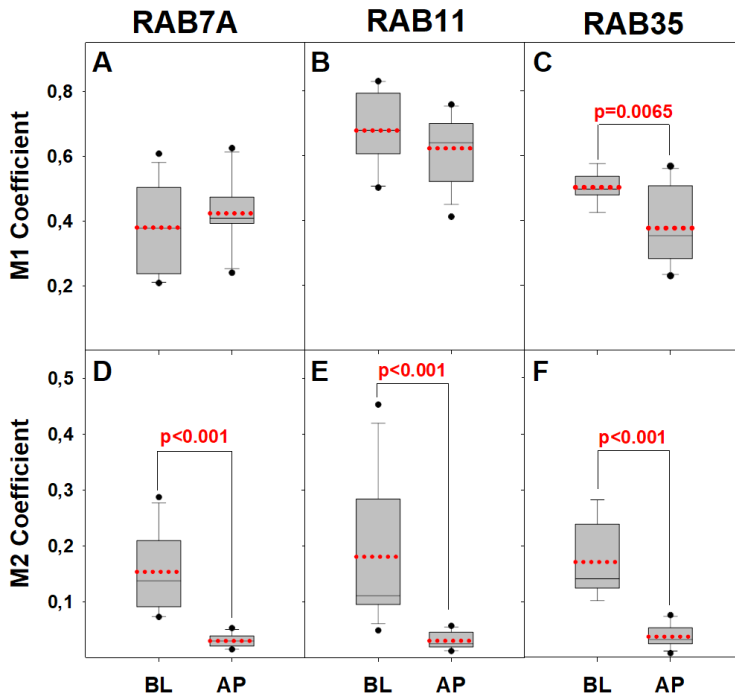


**Figura 20. Distribució de RAB7A, RAB11A i RAB35 al llarg de les membranes basolateral i apical de les cèl·lules Huh7-AI polaritzades. A-F) IIF del marcador basolateral (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase en vermell) i RAB7A, RAB11A, RAB35 (en verd). G-L) IIF del marcador apical (marcador ZO-1 en vermell) i RAB7A, RAB11A, RAB35 (en verd). Els nuclis estan tenyits de blau. La reconstrucció de les imatges és adquirida a partir de seccions seriades de 0,50µm. Les imatges estan en el pla axial i el pla sagital, on les barres blanques corresponen a 25µm i 10µm, respectivament.**



Per tal d'estimar la colocalització diferencial de cada RAB amb els marcadors de membrana es va fer també l'anàlisi quantitatiu. S'observa que les proporcions de membrana BL i AP que colocalitzen amb RAB7A (M1) són de 38% i 42% (**Figura 21A**), respectivament, i amb RAB11A de 68% i 62% (**Figura 21B**), respectivament, indicant en ambdós casos que aquestes proteïnes es troben en proporcions similars en les dues membranes. En canvi, els resultats mostren que la membrana BL colocalitza significativament més amb la proteïna RAB35 respecte la membrana AP (50% vs 38%,  $p=0.0065$ , respectivament) (**Figura 21C**). Aquestes dades estarien indicant que la població HP podria estar sortint més eficientment per aquesta membrana que no pas la població L0. Per altra banda, cal tenir en compte que les elevades proporcions de colocalització amb la proteïna RAB11A respecte a les demés, podria ser explicat per els alts nivells d'expressió d'aquesta proteïna.

Per altra banda, no s'observen diferències significatives entre la proporció de RAB7A, RAB11A i RAB35 colocalitzant amb la membrana BL ( $15.5 \pm 7.0$ ;  $18.2 \pm 12.6$  i  $17.2 \pm 6.4$  respectivament) ni tampoc amb la membrana AP ( $3.1 \pm 1.1$ ;  $3.1 \pm 1.5$  i  $3.9 \pm 2.0$  respectivament; **Figura 21D-F**). No obstant, és estadísticament significatiu ( $p < 0.001$ ) la major proporció de RAB localitzats en la membrana BL respecte l'AP. Aquest fet podria estar explicat per l'extensa superfície d'aquesta membrana respecte a la membrana apical [255].



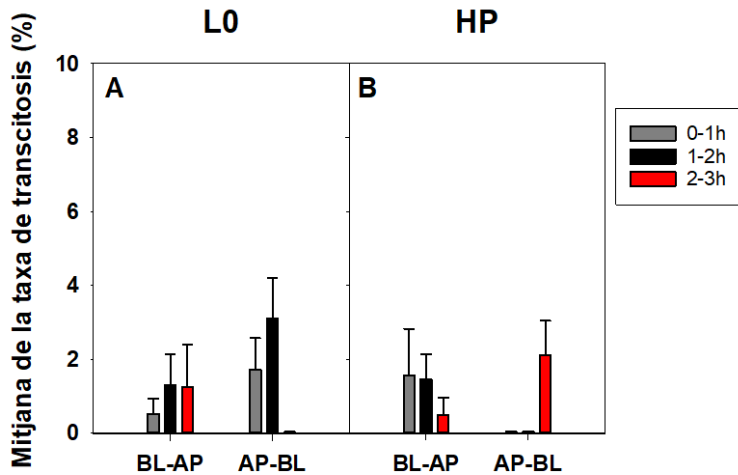
**Figura 21. Colocalització de les proteïnes RAB en la membrana basolateral i apical. A-C)** Anàlisi quantitativa de microscòpia confocal de la proporció de marcadors basolaterals (Na+K+ ATPase) i apicals (ZO-1) co-localitzant amb RAB7A, RAB11A i RAB35. **D-F)** Anàlisi quantitativa de microscòpia confocal de la proporció de RAB7A, RAB11A i RAB35 colocalitzant amb els marcadors basolaterals (Na+K+ ATPase) i apicals (ZO-1). Hi ha diferències estadísticament significatives entre les dues poblacions quan la  $p \leq 0.05$ .

### 3.2.6 Sortida vectorial de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI polaritzades

Un cop analitzada la colocalització del virus amb les diferents proteïnes RAB i la localització d'aquestes GTPases en les membranes BL i AP, vam decidir estudiar la sortida de les partícules de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI polaritzades crescudes sobre membranes d'inserts de *transwell*. La polarització es va dur a terme durant 14 dies, sota les condicions explicades en l'apartat 7.6 de materials i mètodes. Un cop polaritzades, les cèl·lules van ser infectades amb les dues poblacions d'HAV, la parental L0 i la població HP, amb una MOI de 5 a través de

la membrana BL tal i com succeeix de manera natural en la infecció *in vivo* i també, a través de la membrana AP, seguint el protocol de l'apartat 7.6.2.

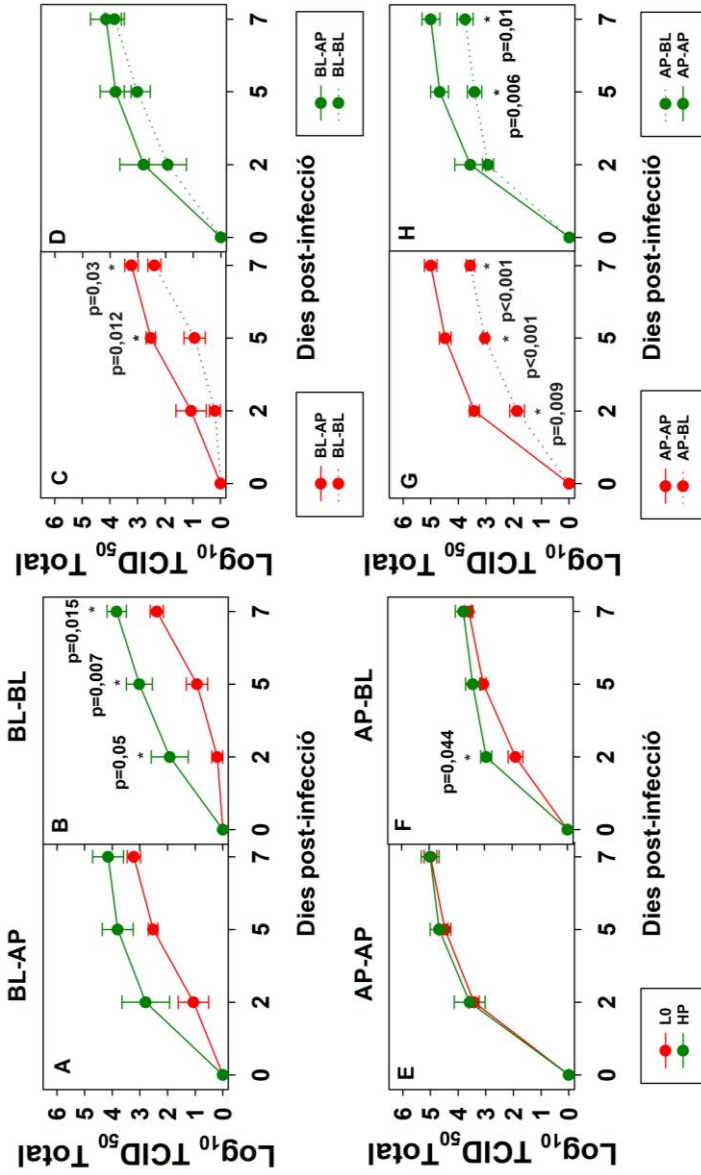
Per mesurar si la infecció del virus alterava la permeabilitat cel·lular, es va testar la transcitosis del virus de la membrana BL a l'AP (BL-AP) i de la membrana AP a la BL (AP-BL) als temps 0, 1, 2 i 3 h p.i. Es van realitzar un total de tres experiments amb tres rèpliques cada un i cada rèplica va ser titulada dues vegades. Per calcular la transcitosis es va recollir el sobrenedant dels dos compartiments del *transwell* i es va mirar els virus que havien passat d'un compartiment a l'altre respecte la quantitat total present en els dos compartiments. S'observa que només un percentatge molt petit dels virions va passar a través de les cèl·lules per transcitosis (Figura 22).



**Figura 22. Mitjana de la taxa de transcitosis en cèl·lules Huh7-A1 polaritzades.** A) Transcitosis de la soca L0 calculada en intervals d'1 hora a 37°C i expressat com la mitjana  $\pm$  SE del percentatge del virus afegit. B) Transcitosis de la soca HP calculat i expressat de la mateixa manera. BL-AP: percentatge de virus alliberats a la cambra apical després d'infectar les cèl·lules per la cambra basolateral. AP-BL: percentatge de virus alliberats a la cambra basolateral després d'infectar les cèl·lules per la cambra AP. Els virus es van quantificar per l'assaig d'infectivitat TCID<sub>50</sub>/ml en cèl·lules FRhK-4.

Posteriorment, es van recollir les partícules produïdes en els sobrenedants d'ambdós compartiments del *transwell*, BL i AP, a temps 0, 2, 5 i 7 dies p.i. El títol a temps 0 correspon al títol després de les 3 h p.i. més dos rentats, el qual es va sostreure per observar l'augment de títol als 2, 5 i 7 dies.

Seguint el curs natural de la infecció, quan les cèl·lules van ser infectades amb el virus a través de la membrana BL, la sortida de l'HAV va ser a través dels dos dominis de la membrana, tant pel basolateral com l'apical (**Figura 23A-D**). Per a la població HP aquesta sortida és igual per la membrana AP que per la BL (**Figura 23D**), en canvi per a la població L0 la sortida és significativament major a través de la membrana apical ( $p < 0.05$ ) (**Figura 23C**). Cal destacar que la sortida de la població HP a través de la membrana BL és significativament major que la de la població L0 ( $p < 0.05$ ) (**Figura 23B**) mentre que no ho és per la membrana apical (**Figura 23A**). Amb aquests resultats associaríem la localització preferencial de RAB35 en la membrana BL i el seu ús per part dels virions de la població HP.



**Figura 23. Entrada i sortida del virus per les membranes basolateral i apical en cèl·lules Huh7-A1 polaritzades.** A) Virus totals alliberats a través de la membrana apical (AP) després de la infecció per la membrana basolateral (BL) (BL-AP). B) Virus totals alliberats a través de la membrana BL després de la infecció per la membrana BL (BL-BL). C) Virus totals alliberats de la població L0 a través de la membrana AP o BL després de la infecció per la membrana BL. D) Virus totals alliberats de la població HP a través de la membrana AP o BL després de la infecció per la membrana BL. E) Virus totals alliberats a través de la membrana AP després de la infecció per la membrana AP (AP-AP). F) Virus totals alliberats a través de la membrana BL després de la infecció per la membrana AP (AP-BL). G) Virus totals alliberats de la població L0 a través de la membrana AP o BL després de la infecció per la membrana AP. H) Virus totals alliberats de la població HP a través de la membrana AP o BL després de la infecció per la membrana AP. Hi ha diferències estadísticament significatives entre les dues poblacions quan la  $p < 0.05$ .

Sorprenentment, la infecció a través de la membrana AP va ser molt eficient amb les dues poblacions d'HAV, tenint una sortida significativament més eficient per la membrana AP (**Figura 23E**). La sortida per la membrana BL als 2 dies p.i. és significativament més alta per la població HP que per la població L0, però en els següents dies no s'observen diferències significatives (**Figura 23F**).

### 3.2.7 Anàlisi d'alineament d'aminoàcids del fragment 130-137 de la proteïna VP2

Com s'ha comentat en els antecedents, només existeixen dues substitucions aminoacídiques entre la població L0 i la HP: L123F a la proteïna VP1 i S134G a la proteïna VP2. Ja s'ha mencionat que aquesta darrera substitució podria facilitar l'accessibilitat del primer *late-domain* de la VP2 amb el domini V d'ALIX en la soca HP, afavorint l'ús de la via de biogènesis d'exosomes regulada per sindecà-ALIX. Per aquesta raó ens vam preguntar com de conservada està aquesta posició al llarg dels diferents hepatovirus descrits fins el moment.

Per aquest anàlisi, vam alinear 129 seqüències de VP2 de 9 espècies d'hepatovirus que infecten 34 espècies de mamífers diferents disponibles al GenBank (EU526089, M20273.1, AY644676, AB279732, AB300205, M14707, HQ246217, KX088647, M59286, D00924, EU140838, KR703607, MG181943, KT452631-KT452747). Aquest alineament ens va revelar que els hepatovirus que infecten primats, és a dir humans i ximpanzés, amb l'excepció de la soca HP, tenen una Serina (S) a la posició 134 de la VP2, mentre que la resta d'hepatovirus que infecten simis no-primats, foques, rosegadors, eriçons, musaranyes, ratpenats i marsupials, tenen una Glicina (G), igual que la població HP (**Figura 24**).

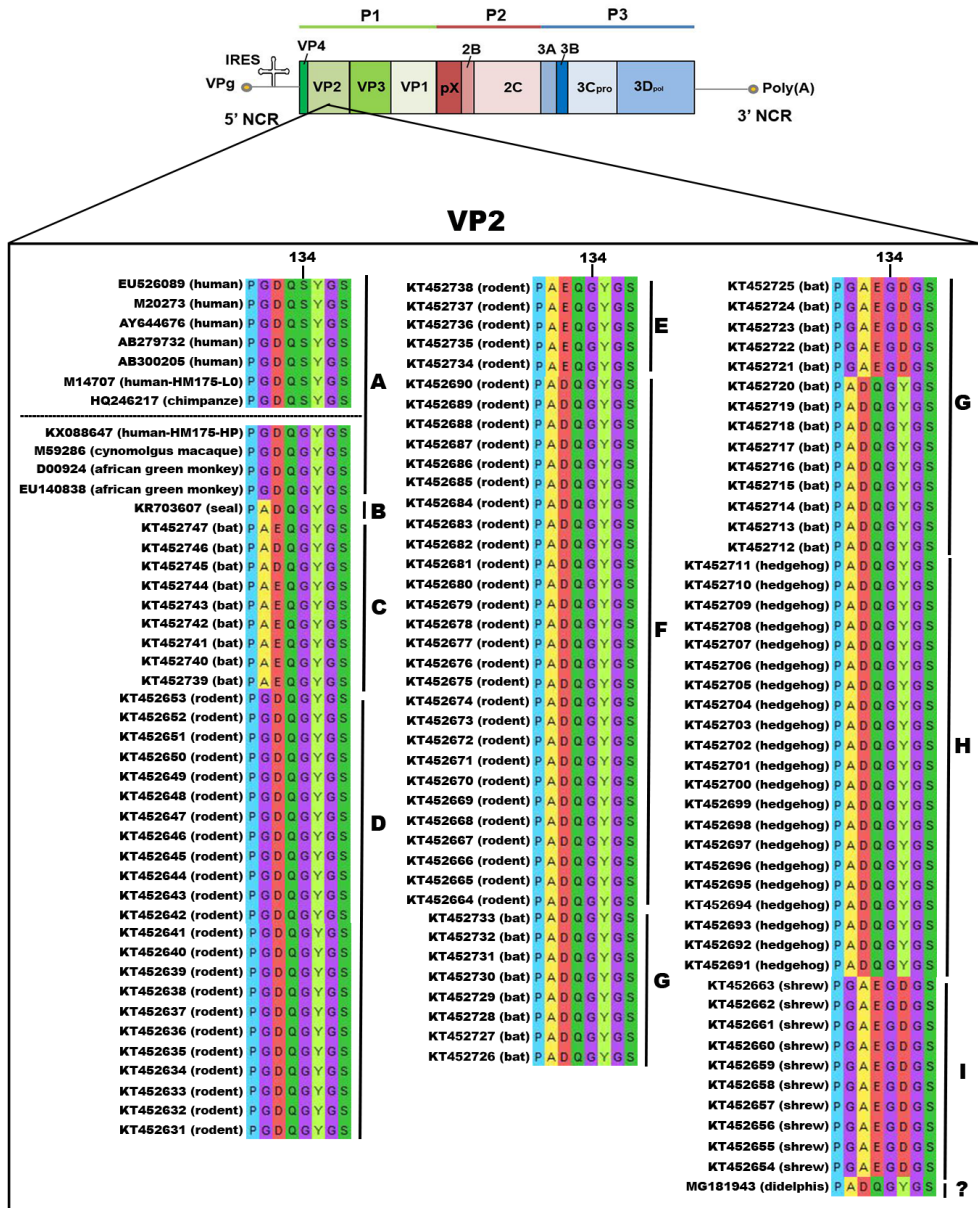


Figura 24. Alineament aminoacídic dels residus al voltant de la posició 134 de la proteïna VP2 de 9 espècies d'hepatovirus que infecten diferents espècies de mamífers. L'esquema del genoma d'HAV està il·lustrat sobre l'alineament. La posició 134 de la VP2 està indicada amb una línia negra vertical. Els residus estan identificats seguint el codi de colors del Mega (A en groc, E i D en vermell, G en magenta, Y en verd clar, Q i S en verd i P en blau). L'alineament va ser construït a partir de 132 seqüències de 9 espècies d'hepatovirus existents infectant 34 espècies diferents de mamífers disponibles al GenBank.

Aquests resultats sorprenents ens van portar a pensar que segurament els primats hagin evolucionat per intentar evadir la forta resposta immune innata que es donaria davant la sortida per la membrana basolateral.

### **3.2.8 Anàlisi d'alineament d'aminoàcids del fragment 119-126 de la proteïna VP1**

La població HP té una substitució aminoacídica a la posició 123 de la proteïna VP1. Per aquesta raó, vam voler també realitzar un alineament de diferents seqüències que contenen la posició 123 de la proteïna VP1 per tal de veure com de conservada està al llarg dels diferents hepatovirus descoberts fins ara.

Per aquest anàlisi, vam alinear 28 seqüències de VP1 de 9 espècies d'hepatovirus disponibles al GenBank (EU526089, M20273, AY644676, AB279732, AB300205, HQ246217, M14707, KX088647, M59286, D00924, EU140838, NC\_027818, KR703607, MG181943, KT452637, KT452641, KT452644, KT452658, KT452661, KT452685, KT452691, KT452695, KT452698, KT452714, KT452729, KT452730, KT452735, KT452742). En aquest alineament no es va observar cap patró pel que fa a la substitució L123F (**Figura 25**).



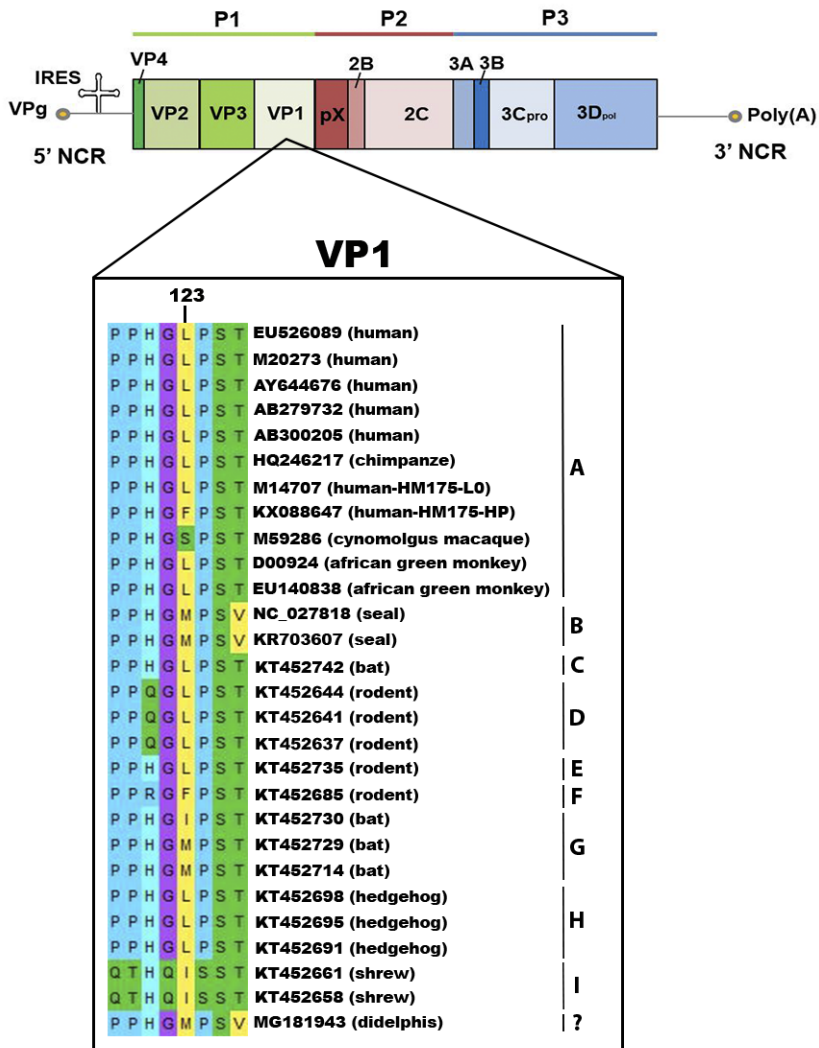


Figura 25. Alineament aminoacídic dels residus al voltant de la posició 123 de la proteïna VP1 de 9 espècies d'hepatovirus que infecten diferents espècies de mamífers. L'esquema del genoma d'HAV està il·lustrat sobre l'alineament. La posició 123 de la VP1 està indicada amb una línia negra vertical. Els residus estan identificats seguint el codi de colors del Mega (F, I, L, M i V en groc, G en magenta, Q, S i T en verd, H en blau fluix i P i R en blau). L'alineament va ser construït a partir de 28 seqüències de 9 espècies d'hepatovirus existents infectant diferents espècies de mamífers disponibles a GenBank.

## 3.2 Discussió

Fins fa 10 anys, el virus de l'hepatitis A (HAV) s'havia classificat com a virus no embolcallat. No obstant, l'any 2013, el grup del professor Stanley Lemon va descriure l'existència de partícules del virus quasi-embolcallades (eHAV) per la pròpia membrana de la cèl·lula [256]. El descobriment d'aquest nou fenotip ha produït un gran canvi de paradigma en el model del cicle biològic de l'HAV i des de llavors, la biogènesis d'aquestes partícules quasi-embolcallades ha estat plena d'incògnites. Tots els estudis realitzats fins al moment indiquen que la biogènesis de l'eHAV depèn del trànsit intracel·lular del virus, el qual segurament involucra la proteïna ALIX o la HD-PTP associades al complex ESCRT en la via sindecan-ALIX. En una tesis anterior del grup, mitjançant microscòpia confocal i silenciament gènic, es va mostrar que ALIX interacciona més amb la població HM175-HP que amb la parental HM175-L0. Aquest fet obre la possibilitat que les dues soques surtin per dues vies diferents. El nostre estudi proporciona novetats rellevants sobre la sortida vectorial de les dues poblacions d'HAV.

Els hepatòcits són cèl·lules epitelials multipolars úniques amb múltiples dominis apicals, laterals i basolaterals, donant lloc a vies de trànsit molt específiques i complexes. Aquest tràfic està regulat per proteïnes RAB, les quals són essencials pel tràfic de membrana i el transport intracel·lular de vesícules. Les nostres dades sobre els nivells d'expressió de RAB7A, RAB11A i RAB35 mostren una relació amb el nivell de replicació de cadascuna de les poblacions d'HAV en cèl·lules Huh7-AI no polaritzades. En particular, quan les cèl·lules són infectades amb la població HP, el nivell d'expressió de les proteïnes RAB augmenta més que quan les cèl·lules són infectades amb L0. Aquest augment segurament és resultat de la major taxa de replicació de la població HP. Aquests resultats ens porten a pensar que les cèl·lules responen expressant més

quantitat d'aquests RAB per tal de dirigir les vesícules intraluminals amb HAV en el seu interior cap a la membrana i ser alliberades a l'espai extracel·lular.

L'estudi d'immunofluorescència confocal utilitzat per analitzar el paper de les proteïnes RAB en les fases finals del cicle del virus de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI no polaritzades, mostra que les càpsides de L0 colocalitzen clarament amb RAB7A, mentre que les càpsides de HP colocalitzen molt més amb RAB35. Ambdues poblacions, L0 i HP, podrien utilitzar RAB11, i preferentment les proteïnes RAB7A i RAB35, respectivament, en la via de sortida a través dels MVB.

Per altra banda, aquest estudi també recalca de nou l'alta replicació de la població HP en comparació amb L0 en cèl·lules Huh7-AI, cosa que indica que aquest augment de la taxa de replicació de la població HP no és exclusiu de la línia cel·lular FRhK-4, a la qual es troba adaptada [231].

En diferents estudis s'ha demostrat que la inhibició o silenciament del RAB7 [235], RAB11 [236] i RAB35 [238] pot interferir en l'alliberament de vesícules extracel·lulars a l'espai extracel·lular. En el nostre cas, l'estudi de silenciament gènic del RAB35 provoca una caiguda notable del 50% de la quantitat de virus alliberats a l'espai extracel·lular per a la població HP, coincidint amb un augment en l'espai intracel·lular. En canvi aquesta tendència no s'observa per a la població L0 amb cap dels RAB analitzats. Aquests resultats assenyalen que la soca HP utilitzaria preferentment la xarxa de tràfic controlada per RAB35 per a la seva sortida de la cèl·lula, cosa que concorda amb les observacions fetes en l'estudi d'immunofluorescència confocal, on la soca HP colocalitza preferentment amb el RAB35. En canvi, pel que fa a la població L0 no es pot assegurar que utilitzi majoritàriament un RAB, però mitjançant l'anàlisi dels *fold changes* de les còpies genòmiques intracel·lulars i els virus a sobrenedant

sembla que tindria certa preferència a fer ús de la xarxa de trànsit controlada pel RAB7A, i en menor mesura RAB11A.

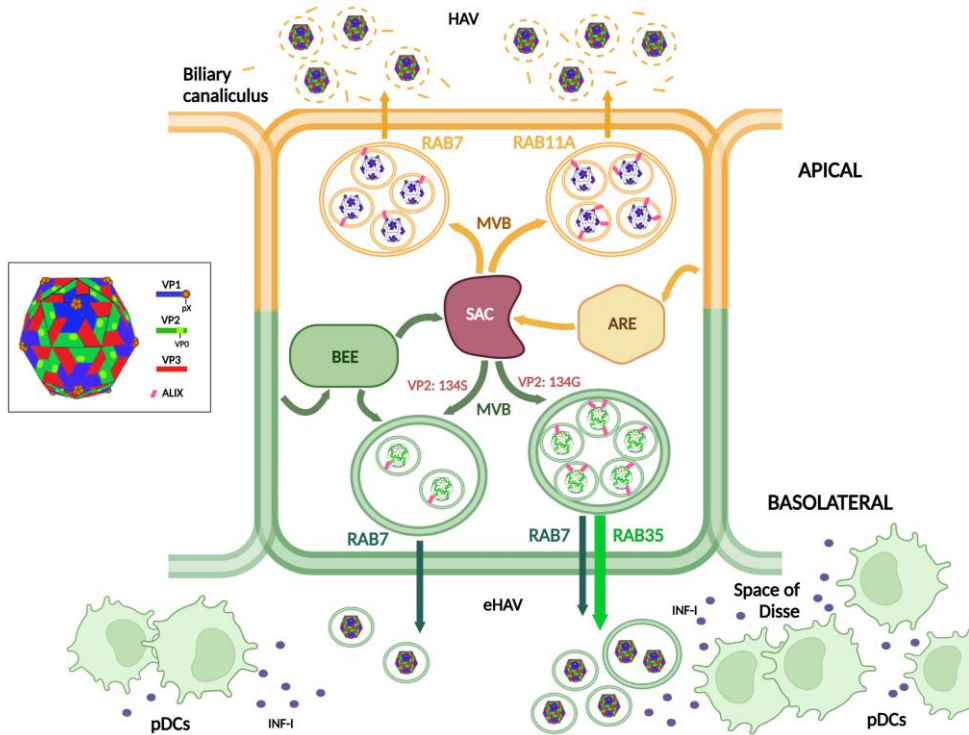
Fins fa poc, el paper de la polaritat dels hepatòcits en la patogènesi i transmissió de virus hepatotòpics, com l'HAV o l'HCV, no s'havia estudiat en detall, principalment a causa de la manca de models de cultiu d'hepatòcits amb una polarització funcionalment rellevant. Com a conseqüència, l'estudi del cicle de la biogènesi d'HAV en línies cel·lulars derivades d'hepatòcits ha tingut una sèrie de limitacions. No obstant, actualment s'ha convertit en una àrea d'investigació molt important gràcies als últims avenços en models de cultiu cel·lular d'hepatòcits polaritzats, especialment en el camp de l'HCV [257]–[259]. El model de cèl·lules Huh7-AI polaritzades al llarg d'aquest estudi, ens ha permès estudiar la localització de les proteïnes RAB, així com també l'entrada i sortida de l'HAV a través de les diferents membranes de l'hepatòcit.

Primerament, l'estudi d'immunofluorescència confocal utilitzat per analitzar la distribució de les proteïnes RAB en la membrana BL i AP de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI polaritzades, mostra que RAB7A, RAB11A i RAB35 es troben localitzats tant en la membrana BL com en l'AP. Tanmateix, mentre que les proteïnes RAB7A i RAB11A es troben repartides per igual en ambdues membranes, la proteïna RAB35 es troba preferentment localitzada en la membrana BL. Aquests resultats suggereixen que la població HP, la qual utilitza preferentment la via de sortida dirigida per RAB35, sortiria més eficientment per la membrana BL que la població L0.

En segon lloc, el nostre estudi sobre la sortida del virus en cèl·lules Huh7-AI polaritzades en un sistema de *transwells*, demostra que la sortida de l'HAV es dona a través dels dos dominis de membrana, BL i AP, però en proporcions diferents a les prèviament descrites. En estudis anteriors s'havia observat que

la sortida de l'HAV a través del domini basolateral era major al 95% [92], [254], suggerint que el virus podria després entrar de nou als hepatòcits i mitjançant un procés de transcitosis arribar a la membrana apical on seria alliberat. Posteriorment, en un altre estudi s'havia descrit que la sortida a través dels dominis basolateral i apical és més similar, suggerint els dos dominis com a possibles vies de sortida de l'HAV [93]. Per la població HP aquesta sortida és similar per les dues membranes, mentre que per la població L0 la sortida és significativament més alta a través de la membrana AP. Tot plegat, aquests resultats suggereixen la localització preferencial de RAB35 en la membrana BL i el seu ús per part dels virions de la població HP.

A partir d'aquests resultats, proposem que les soques de L0 i HP poden utilitzar diferents compartiments de l'hepatòcit per a la biogènesi de les partícules quasi-embolcallades (**Figura 26**). La població L0 utilitzaria preferentment el compartiment ARE i en menor mesura el SAC. Des de l'ARE s'alliberaria a través de la membrana AP controlada per RAB7A i RAB11A, i a partir del SAC, a través de la membrana BL controlada per RAB7 i RAB35. Al contrari, la població HP utilitzaria més el compartiment BEE i sortiria de la cèl·lula per la membrana BL dirigida per RAB35 i en menor mesura sortiria a través de la membrana AP utilitzant RAB7A i RAB11A.



**Figura 26. Representació esquemàtica de la sortida vectorial del virus de l'hepatitis A en hepatòcits humans polaritzats.** L'HAV que entra per la membrana basolateral (BL) per endocitosi donant a un endosoma temprà basolateral (BEE) es dirigeix més eficientment cap al compartiment endosomal subapical (SAC) i a través de la formació de cossos multivesiculars (MVB) surt per la membrana BL en forma d'eHAV, on haurà de fer front a les cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDCs). Per altra banda, l'HAV endocitat per endosomes de reciclatge apicals (ARE) també es dirigeixen cap al SAC i formant MVB surt a través de la membrana AP en forma d'HAV, i en menor mesura per la membrana BL. Les proteïnes RAB regulen aquest tràfic dins dels hepatòcits, les quals incrementen la sortida de l'HAV que presenti una serina en la posició 134 de la VP2 per la membrana AP en forma de partícula nua mentre que el que presenti una glicina, serà dirigit més eficientment per la membrana BL sortint en forma de partícula quasi-embolcallada.

En els nostres experiments la sortida basolateral és menys eficient a la prèviament descrita [92], [93], [254]. Això podria venir explicat pels diferents dissenys experimentals utilitzats en cada estudi: diferents soques del virus i sistemes cel·lulars (HM175p16 i HM175A.2 en les cèl·lules N6 del clon HepG2, HM17518f en cèl·lules similars a hepatòcits derivades de cèl·lules mare i HM17543C en Huh7-AI), diferents tipus d'inòcul (partícules nues o quasi-embolcallades) i diferents temps post-infecció.

La càpsida de la població HM175-HP presenta dos canvis no sinònims respecte la població parental L0. El primer d'ells es troba en la posició 134 de VP2, molt propera als residus 144-149 (4.5Å de distància) del primer *late domain* i dona lloc a un canvi aminoacídic no conservatiu d'una serina (S) per una glicina (G), la qual és un aminoàcid més flexible i podria fer més accessible la Tyr144, essencial per a la interacció del primer *late domain* 144-149. Prèviament, s'havia suggerit que aquest canvi podia facilitar la interacció de la població HP amb la proteïna ALIX, afavorint així la seva sortida de l'hepatòcit a través dels cossos multivesiculars [84], [222], [223]. El segon canvi es troba localitzat a la posició 123 de VP1 i està molt lluny d'aquest lloc d'unió a ALIX. Per aquesta raó, no es creu que pugui implicar canvis d'interacció amb la proteïna ALIX.

L'anàlisi d'alineament de la posició 134 de la proteïna VP2 i la posició 123 de la proteïna VP1 revela que no hi ha cap patró de variabilitat a la posició 123 de VP1, però sí es detecta una clara diferència a la posició 134 de VP2. Tots els hepatovirus que infecten primats, incloent humans i ximpanzés, tenen una serina en la posició 134 de VP2, excepte la població HP. En canvi, tots els que infecten simis no-primats, foques, rosegadors, eriçons, musaranyes, ratpenats i marsupials tenen una glicina. Es desconeix el significat d'aquest patró, però porta a pensar que pot estar relacionat amb la forta resposta immune dels primats [260]. Els simis primats munten una resposta immune inicial més forta a les infeccions víriques que els simis no primats, incloses les resposta d'interferó (INF) alfa i gamma. Les cèl·lules dendrítiques plasmocitoides intrahepàtiques (pDC) estan presents de manera transitòria durant l'inici de la infecció per HAV en ximpanzés i després desapareixen. En un estudi *in vitro* s'ha observat que pDCs co-cultivades amb Huh-7.5 o FRhK-4 i posteriorment, infectades amb eHAV, produeixen grans quantitats d'INF- $\alpha$  [261](**Figura 48**), però, a diferència del que s'havia observat prèviament amb HCV [262], no

requereix de replicació viral, és a dir, l'activació de les pDCs sense replicació és suficient. Tot plegat suggereix que els hepatovirus que infecten primats poden haver evolucionat cap a evadir la resposta de les pDCs més forta en simis superiors adquirint aquest reemplaçament d'una G per una S a la VP2, el qual reduiria la sortida a través de la membrana basolateral. No obstant, la falta de dades comparatives sobre la resposta antiviral que es munta contra la infecció per hepatovirus en micos i petits mamífers, dificulta poder confirmar la nostra hipòtesi.

Darrerament, s'ha descrit el paper de la proteïna VP1-pX en controlar la invaginació de les procàpsides de l'HAV als MVB [228], [229]. Aquest recent descobriment no és incompatible amb la biogènesi dirigida per sindecà-ALIX i el paper dels *late domains* de la VP2. Pot ser possible que la proteïna pX de la VP1 i els *late domains* de la VP2 dirigeixin l'entrada al compartiment ARE i SAC, respectivament. De fet, per un virus tan sigil·lós com l'HAV, la possibilitat d'utilitzar diferents vies podria ser un gran avantatge.

Un altre tema intrigant és l'impacte negatiu en la propagació cèl·lula-cèl·lula que pot tenir l'elevada sortida a través de la membrana apical respecte a la basolateral. Tot i que una alta proporció de sortida apical garanteix l'excreció fecal i la transmissió entre pacients en les fases més avançades de la infecció, es requereix la transmissió d'hepatòcit a hepatòcit en les fases inicials de la infecció, suposadament a través de la membrana basolateral. Sorprenentment, en el nostre sistema s'ha trobat que la propagació de les partícules eHAV entre els hepatòcits és més eficient i robusta a través de l'entrada i sortida apical que l'entrada i sortida basolateral. Aquests resultats obren una nova hipòtesi sobre el model del cicle enterohepàtic, suggerint que el virus que es troba en el canalicule biliar per ser excretat en femtes, pot tornar a entrar a hepatòcits veïns a través de la membrana apical. Es desconeix l'impacte



real *in vivo*. No obstant, en el domini apical dels hepatòcits s'han descrit processos d'endocitosis involucrats en el reciclatge i en el transport intracel·lular mitjançant vesícules, als quals es troba involucrada l'annexina VI, una proteïna estructural que serveix com a marcador d'endosomes hepàtics del compartiment basal o apical [263]. La nostra hipòtesis és que el virus utilitza o mimetitza algun d'aquests processos descrits per tornar a entrar a la cèl·lula a través del domini apical.

Els nostres experiments de polarització han estat realitzats en un model *in vitro* de monocapes columnars d'hepatòcits (cèl·lules Huh7-AI), com la d'un epiteli columnar simple, en canvi els hepatòcits del fetge *in vivo* mostren una polarització complexa i específica amb una distribució tridimensional amb múltiples dominis apicals, laterals i basolaterals, la qual podria fer variar els resultats. D'altra banda, es van utilitzar partícules eHAV, les quals teòricament es degraden sota l'acció de la bilis i es converteixen en partícules nues al canalicle biliar. No obstant, el trencament complet de l'embolcall és difícil d'aconseguir *in vitro* mitjançant concentracions fisiològiques de sals biliars en humans. Com a resultat s'obté una barreja de conformacions que va des de partícules nues a partícules parcialment embolcallades. De fet, s'ha pogut recuperar virus de la vesícula biliar de ratolins infectats, en els quals s'ha vist diferents conformacions de partícules d'HAV [93]. És temptador especular que els estats intermedis poden encara ser infecciosos i ser endocitats a través de la membrana apical, canviant així la visió del cicle biològic de l'HAV. A més, no podem ignorar la necessitat de nous estudis per determinar quin és i on es troba el receptor responsable de la infecció de l'HAV en els hepatòcits, el qual segueix sent desconegut. Trobar el receptor seria un gran avenç en la investigació del cicle biològic.

**4. CAPÍTOL 2. Avaluar el  
potencial de la població  
HM175-HP com a candidata  
vacunal**



## 4.1 Antecedents

L'hepatitis A és sovint una malaltia oblidada, però de fet encara es produeixen grans brots que provoquen alertes sanitàries arreu del món. Moltes vegades la situació es veu empitjorada degut al desabastiment temporal de vacunes contra l'HAV [196]. Les vacunes inactivades, en general, requereixen d'alts títols vírics així com d'adjuvants per potenciar la seva resposta immune [198], [214]. La producció industrial de vacunes víriques inactivades requereix d'una gran quantitat d'antigen, la qual cosa és un repte quan es tracta d'un virus de baixa replicació com és el cas de l'HAV. Existeixen algunes soques d'HAV adaptades a multiplicar en cultiu cel·lular (HM175, CR-326, GBM, TZ84, Lv-8, YN5 i RG-SB), però ho fan amb rendiments molt pobres de producció d'antigen [28], [264].

En el grup de Virus Entèrics, com ja s'ha mencionat anteriorment, s'ha obtingut una població de replicació ràpida, anomenada HM175-HP, mitjançant un procés de selecció genòmica i *molecular breeding* a partir de la soca HM175-L0, la qual s'ha adaptat a multiplicar en condicions de *shutoff* cel·lular induït artificialment amb la droga actinomicina D (AMD) [61], [231]. Com a resultat, la soca HM175-HP es caracteritza per tenir un fenotip de replicació més ràpid en cultius *in vitro* que la seva soca parental. Aquests atributs es deuen principalment a què presenta un IRES més eficient juntament amb un ús de codons optimitzat en la regió VP1 de la càpsida. Tot el procés de selecció de la soca HM175-HP es va produir en la línia cel·lular FRhK-4 (*Fetal Rhesus kidney*)[231] i està detallat en l'apartat 7.1.3.

Tal i com s'ha comentat en la introducció, les parades transitòries del complex traduccional degudes a l'abundància de codons rars, contribueixen al

correcte plegament de les proteïnes estructurals. De fet, aquest estudi on s'ha adaptat l'HAV a replicar en condicions de *shutoff* cel·lular artificial ha permès comprovar com n'és d'important el paper dels codons rars en la regió de la càpsida i a la vegada, en la *fitness* [22].

Quan l'HAV és cultivat en presència d'AMD experimenta una caiguda de *fitness*, que es va recuperant durant el procés d'adaptació. La recuperació de la *fitness* s'associa als canvis en l'ús de codons de la regió de la càpsida que implica una disminució de l'ús dels codons rars per competència i la seva substitució per codons rars vertaders en algunes posicions específiques, així com l'augment de codons abundants en altres posicions. Aquests canvis tenen un efecte molt important en la velocitat de traducció i en la conformació de la càpsida [22]. En definitiva, aquest mecanisme d'adaptació al *shutoff* cel·lular artificial demostra que la cinètica de traducció és la que determina el biaix en l'ús de codons de l'HAV en la regió de la càpsida, ja que intervé en la selecció de la combinació de codons rars i freqüents per permetre el correcte plegament de les proteïnes. Tan és així, que els codons rars estan altament conservats en la regió codificant de la càpsida i les mutacions d'aquests són seleccionades negativament inclús en presència de pressió immune [16], [265]. Això explicaria que la soca HP, tot i presentar canvis en l'ús de codons que podrien modificar el plegament de la càpsida, mostra unes característiques antigèniques i físiques similars a la població L0, sent reconeguda antigènica pels anticossos policlonals [61]. Per tant, això obriria la porta a una nova estratègia vacunal basada en la soca HP de replicació més ràpida.

S'ha aconseguit propagar l'HAV en les línies cel·lulars AGMK, BS-C-1, CaCo-2, FRhK-4, FRhK-6, HepG2, Huh-7, LLC-MK2, MRC-5 i Vero. No obstant, les directrius de la OMS recomanen que les vacunes es produeixin en fibroblasts

diploides embrionaris humans (cèl·lules MRC-5, 2BS i KMB17) o en línies cel·lulars contínues derivades del mico verd africà (cèl·lules Vero) [266].

La OMS també recomana fer proves per detectar la presència de qualsevol agent adventici a les cèl·lules, així com en els sèrums o altres reactius susceptibles a ser contaminats com per exemple la tripsina. A més, també recomana fer proves d'oncogenicitat i tumorigenicitat. Les cèl·lules MRC-5 (*Medical Research Council cell strain 5*) obtingudes a partir dels teixits pulmonars fetals humans, són les cèl·lules utilitzades per a la vacuna actual basada en la soca HM175. Tot i haver sigut supervisada pel Comitè d'Experts de l'OMS i complir els requisits, les seves existències estan disminuint i no se'n poden obtenir més degut a problemes tècnics i ètics, ja que és extremadament difícil obtenir nous fibroblats diploides humans dels teixits pulmonars fetals [267]. Per altra banda, les cèl·lules Vero (*African green monkey kidney epithelial*), tot i ser una bona línia cel·lular per a la producció de vacunes, s'ha descrit que poden evolucionar cap a un fenotip neoplàstic a passatges alts, amb el conseqüent problema de seguretat [268].

Els diferents substrats cel·lulars estan associats a variacions en l'eficiència de la purificació del producte final, i els passos per a l'eliminació dels constituents cel·lulars residuals són especialment importants. De fet, l'antigen d'HAV utilitzat per a la producció de vacunes normalment s'obté a partir de la lisis amb detergent de cèl·lules infectades, ja que no s'allibera de manera eficient al sobrenedant del cultiu [269]. Tanmateix, des del descobriment de la nova via de sortida de l'HAV en forma quasi-embolcallada [12] s'ha hagut de reconsiderar tot el model del cicle biològic del virus i obre la porta a dissenyar noves estratègies per millorar l'alliberament del virus al sobrenedant, en lloc d'extreure el virus del substrat cel·lular.

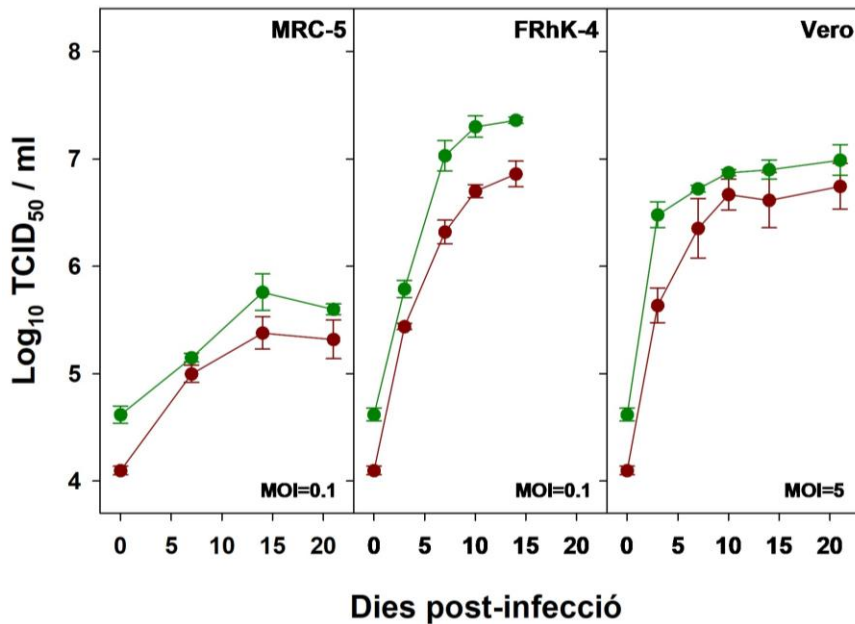
## 4.2 Resultats

### 4.2.1 Replicació del virus en tres línies cel·lulars: MRC-5, Vero i FRhK-4.

Per tal de trobar un millor substrat cel·lular per a la producció d'alts títols vírics, es va realitzar un estudi comparatiu de replicació i alliberació de l'HAV al sobrenedant entre les dues poblacions que disposem en el nostre grup, la població HM175-L0 i la HM175-HP, en tres substrats cel·lulars diferents: les línies MRC-5, Vero i FRhK-4. Aquesta darrera línia compliria tots els requisits demanats pel comitè de vacunes de la OMS, tot i que no es troba entre les recomanades degut a que es tendeix a utilitzar les mateixes línies per totes les vacunes víriques.

Es van sembrar les tres línies cel·lulars (MRC-5, Vero i FRhK-4) en flascons de 25cm<sup>2</sup> de superfície, i un cop assolida la confluència es van infectar amb les dues poblacions L0 i HP, tal i com es detalla en l'apartat 7.1.4, amb una multiplicitat d'infecció (MOI) de 0.1 per les MRC-5 i FRhK-4 i una MOI de 5 per les Vero. Es van recollir els sobrenedants en diferents temps p.i. i posteriorment, es va determinar el títol víric mitjançant la tècnica de TCID<sub>50</sub>, detallada a materials i mètodes a l'apartat 7.1.7. Per obtenir resultats representatius, es van realitzar un mínim de tres infeccions independents amb cadascuna de les poblacions d'HAV i per cadascun dels models cel·lulars.

Els resultats mostren un major rendiment de virus a sobrenedant a temps més curts amb la soca HP en comparació amb la soca L0 en qualsevol de les tres línies cel·lulars (**Figura 27**), i ambdues soques repliquen més eficientment en les cèl·lules FRhK-4 en comparació amb les cèl·lules MRC-5 i Vero.



**Figura 27. Corbes de creixement de les poblacions L0 (vermell) i HP (verd) en les cèl·lules MRC-5, FRhK-4 i Vero.** Els virus del sobrenadant es van mesurar com a unitats infeccioses expressades com a Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml.

Tot plegat suggereix que la línia cel·lular FRhK-4 és idònia per a la replicació de les dues poblacions virals. Tot i no utilitzar-se actualment en la fabricació de vacunes, podria ser una bona candidata per produir antigen d'HAV als nivells requerits i suplir la falta de cèl·lules, com és el cas de les MRC-5, o evitar possibles problemes de tumorigenicitat, com en les Vero. A més, s'ha reportat que estan lliures de característiques tumorigèniques [270].

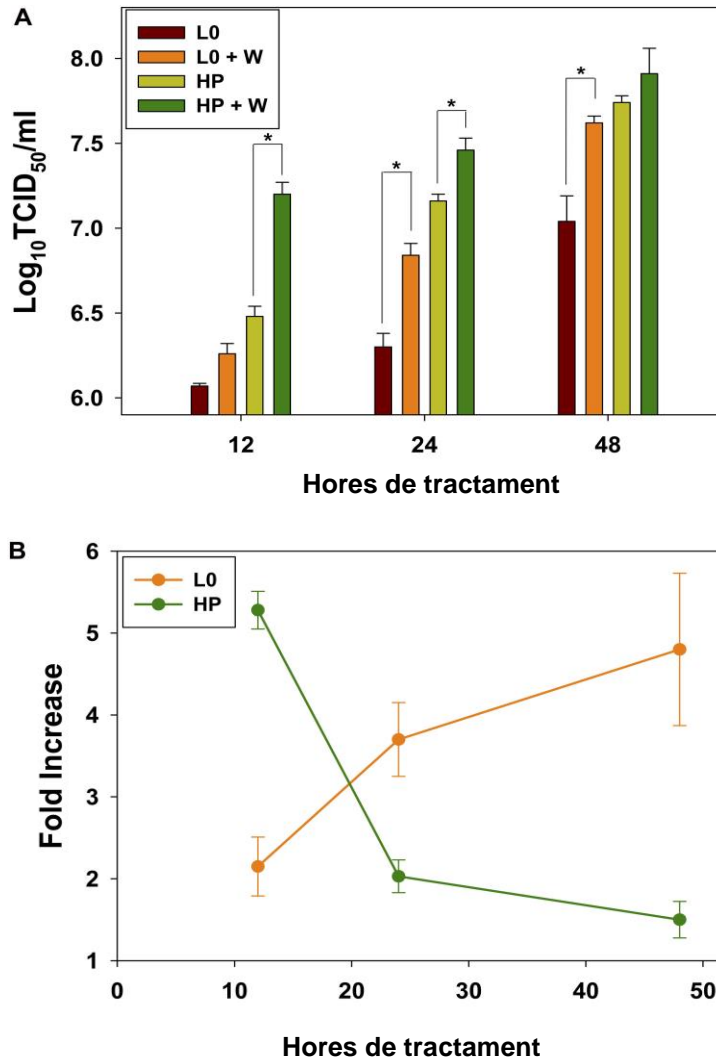


### 4.2.2 Sortida del virus al sobrenedant de cèl·lules FRhK-4 infectades amb L0 i HP

Donat que els resultats anteriors van mostrar que ambdues soques d'HAV repliquen més eficientment en la línia cel·lular FRhK-4, es va decidir tractar d'incrementar encara més l'alliberament dels virions d'eHAV en el sobrenedant del cultiu cel·lular d'aquesta línia cel·lular.

Per dur a terme aquest estudi, es van sembrar les cèl·lules FRhK-4 en flascons de 25cm<sup>2</sup> de superfície, i un cop assolida la confluència es van infectar amb les dues poblacions L0 i HP. A les 24h h p.i. es va afegir wortmanina, una droga que inhibeix la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), i així interfereix amb les rutes de trànsit cel·lular. Posteriorment, vam titular les partícules infeccioses presents en el sobrenedant a les 12, 24 i 48 hores post-tractament, que corresponen a les 36, 48 i 72 h p.i, mitjançant la tècnica de TCID<sub>50</sub>.

Els resultats obtinguts mostren que l'addició de wortmanina en el medi de creixement fa incrementar la sortida d'ambdues poblacions en el sobrenedant en els tres temps post-tractament analitzats (**Figura 28A**). Curiosament, la població HP incrementa significativament la seva sortida al sobrenedant a temps curts de tractament mentre que la població L0 incrementa significativament la seva sortida a temps més llargs de tractament (**Figura 28B**). Els increments, expressats com la mitjana de *fold-increases*, són de 2.15, 3.70 i 4.80 per la població L0 i de 5.28, 2.03 i 1.5 per la població HP a les 12, 24 i 48 hores post-tractament, respectivament.



**Figura 28.** Efecte de la wortmanina en la sortida del virus al sobredant de cèl·lules FRhK-4. A) Títol víric de les soques L0 i HP en absència i presència de wortmanina (W). B) *Fold increase* del títol víric en el sobredant amb tractament amb wortmanina.

### 4.3 Discussió

L'hepatitis A és sovint una malaltia oblidada, però de fet es segueixen produint enormes brots degut a la falta de vacunació contra l'HAV. Estudis *in vitro* han aconseguit propagar soques d'HAV en diversos cultius cel·lulars, però mostren una replicació molt lenta, la qual dificulta la producció requerida d'antigen per una vacuna [28]. Conseqüentment, són molt poques les combinacions soca-línia cel·lular que han servit per produir vacunes inactivades llicenciades. El nostre estudi ha permès demostrar que la població HM175-HP seria una bona candidata per produir una vacuna inactivada més assequible gràcies a la seva ràpida replicació. A més, s'ha trobat un substrat cel·lular òptim per a la producció d'alts títols virals de la soca HM175-HP requerits per la indústria. La línia cel·lular FRhK-4 pot ser una bona candidata per suplir la falta de cultius cel·lulars per a la producció de vacunes. De fet, també ha estat proposada per a la producció a gran escala del poliovirus [270]. A més, s'ha comprovat que està lliure de característiques tumorogèniques [270] i de poliomavirus [271], l'agent adventici que impedia la producció de vacunes mitjançant l'ús de les línies cel·lular de *rhesus* fetal [272].

D'altra banda, s'ha trobat que l'ús de la wortmanina millora l'alliberament d'eHAV i la seva acumulació en el sobrenedant, sobretot en el cas de la població HM175-HP, la qual cosa és un clar avantatge per a la producció i purificació d'antigen. La wortmanina és una droga que inhibeix la PI3K, la qual és necessària per la morfogènesis dels MVB [273], la inducció a l'autofàgia en els lisosomes i la via de senyalització PI3K-Akt-mTOR involucrada en la traducció *cap* dependent i la supervivència cel·lular [274]. Per tant, la inhibició de la PI3K dona lloc a condicions de *shut-off* cel·lular que els virus poden aprofitar per incrementar la seva taxa de replicació [275]. Per altra banda, la via d'autofàgia afavoreix el trànsit dels MVB cap a la degradació, evitant així la secreció de partícules quasi-

embolcallades a l'espai extracel·lular[276]. Si aquesta via es troba inhibida, hi ha un augment de secreció de partícules quasi-embolcallades. Probablement, el major increment de partícules virals al sobrenedant per la població HP respecte la L0, vindria donat per la seva elevada replicació en condicions de *shut-off* cel·lular descrita anteriorment [61], sumat a la major eficiència de sortida en forma de partícules quasi-embolcallades que es veu potenciada per la inhibició de l'autofàgia provocada per la wortmanina [276], [277]. És rellevant destacar que, tot i ser una droga, la vida mitjana de la wortmanina en cultiu de teixits és molt curta [278], el qual previndria els problemes de toxicitat. No obstant, tenint en compte que la producció d'antigen de la soca HM175-HP és també molt alta en absència de wortmanina i que les directrius de la OMS recomanen el mínim d'agents adventicis per a la producció de vacunes, s'ha cregut convenient continuar l'estudi d'immunogenicitat sense la presència de wortmanina.



**5. CAPÍTOL 3. Caracteritzar les propietats immunogèniques en ratolins BALB/C i porcs Large White x Landrace de partícules d'HAV quasi-embolcallades comparades amb partícules nues de les poblacions HM175-HP (HP) i el seu ancestre HM175 (L0)**



## 5.1 Antecedents

Totes les vacunes inactivades contra l'HAV produïdes fins al moment són preparats de virus sencers que es produeixen obtenint el virus a partir d'extractes cel·lulars infectats i posteriorment, inactivant-los amb formaldehid [162]. En el capítol anterior, s'ha exposat la problemàtica d'obtenir els alts títols vírics requerits per la producció de vacunes, donada la baixa replicació de les soques de l'HAV adaptades a replicar en cultiu cel·lular, la qual cosa encareix el preu de les vacunes contra l'hepatitis A, comparat amb altres vacunes com la de la poliomièlitis, i contribueix a l'escassetat de vacunes en situacions de brots quan la demanda supera les reserves. La soca HM175-HP podria representar una solució a aquesta problemàtica, gràcies al seu fenotip de ràpida i més alta replicació, en comparació amb la soca HM175 (L0), molt propera a la soca de la vacuna GSK. A més, l'estudi de la replicació de l'HAV fet en diferents línies cel·lulars suggereix que la línia cel·lular FRhK-4 és idònia per a la replicació de les soques derivades de la HM175. Aquesta idoneïtat fa pensar que la combinació de la soca HM175-HP i la línia cel·lular FRhK-4 podria ser una bona candidata per produir antigen d'HAV als alts nivells requerits per a la producció de la vacuna.

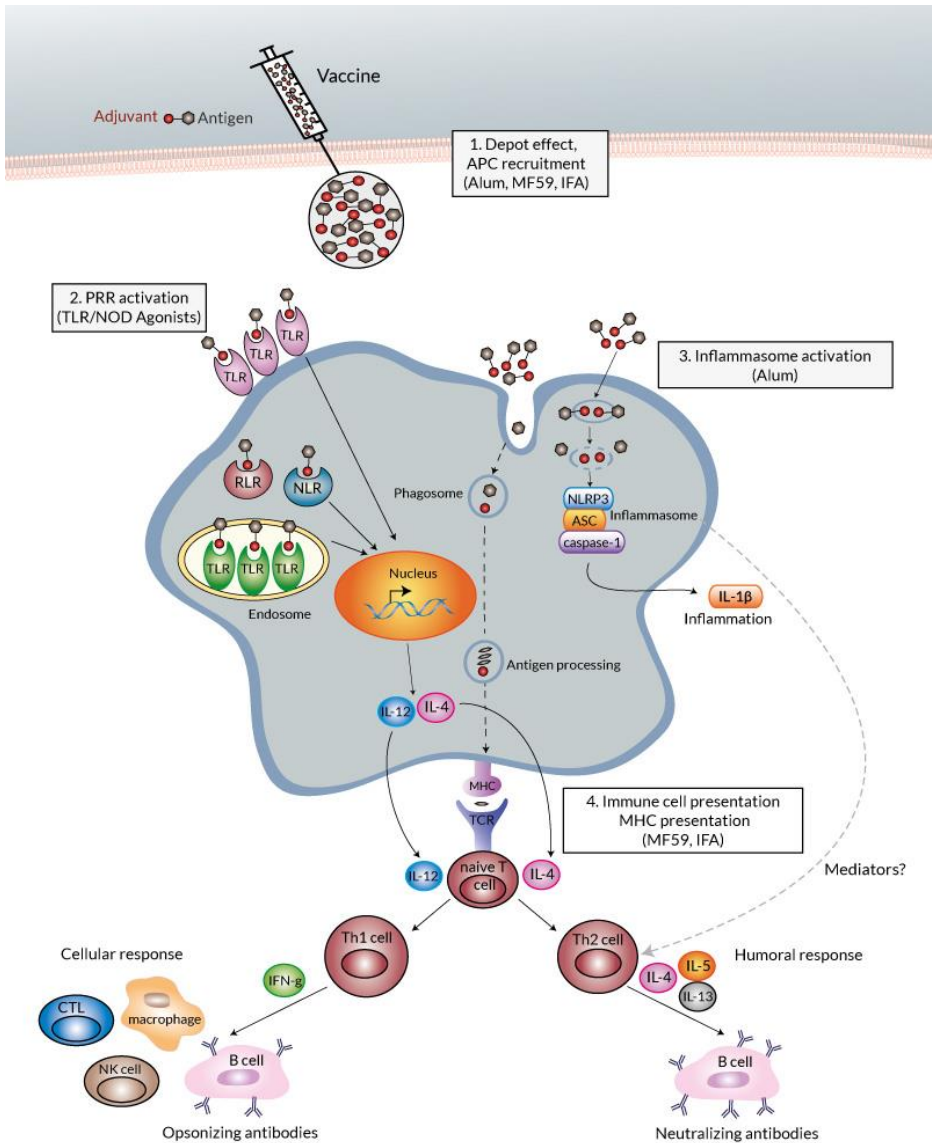
No obstant, un altre inconvenient present en la producció de vacunes és la falta d'adjuvants eficaços i segurs per potenciar la seva resposta immune. Els adjuvants són essencials per millorar i dirigir la resposta immune adaptativa contra els antígens de la vacuna. Aquesta resposta és dirigida per dos tipus principals de limfòcits, les cèl·lules T i B. La resposta immune comença just quan el sistema immune reconeix els epítops dels antígens presents en la vacuna i provoca que s'activin components múltiples de la resposta immune innata (**Figura 29**). Aquests components activats indueixen el reclutament de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC, de l'anglès), les quals són les



encarregades de processar l'antigen i dirigir la presentació d'antigen a través dels complexos d'histocompatibilitat principal (MHC, de l'anglès) que activen els limfòcits T, incloent els CD4+ o Th i els CD8 citotòxics, components de la resposta immune adaptativa. L'activació dels limfòcits CD4+ Th1 o Th2 és la que acaba induint a les cèl·lules B productores d'anticossos [279], [280].

El tipus i magnitud de la resposta de la vacuna dependrà de l'adjuvant utilitzat, ja que cada adjuvant utilitza diferents mecanismes per produir els seus efectes [279]. En el cas de l'hidròxid d'alumini, el qual és l'adjuvant més comunament utilitzat en vacunes víriques, activa una forta resposta Th2 [279], [280] que és poc eficaç contra patògens que requereixen de la immunitat dirigida per les cèl·lules Th1, com és el cas dels virus. No obstant, totes les vacunes inactivades existents contra l'HAV utilitzen hidròxid d'alumini com a adjuvant [28], [162], excepte l'EPAXAL que es troba adsorbit a la superfície de virosomes d'*Influenza* reconstituïts [178], [179].

En circumstàncies normals, la diferenciació de les cèl·lules Th1/Th2 es troba en un estat equilibrat. Per una banda, les cèl·lules Th1 estimulen la resposta immune cel·lular, participant en l'activació de macròfags i induint la producció d'anticossos opsonitzants (IgM i IgG2a) per part de les cèl·lules B. Aquesta resposta Th1 protegeix contra patògens intracel·lulars (protozous, virus i alguns bacteris). Per altra banda, les cèl·lules Th2 generen la resposta immune humoral, la qual activa les cèl·lules B que produeixen anticossos neutralitzants. Aquest tipus de resposta és essencial per l'eliminació de patògens extracel·lulars. Les vacunes actuals contra l'HAV indueixen bàsicament una resposta Th2 [279], [281], [282].



**Figura 29. Esquema model de la generació de la resposta immune front a una vacuna.**

Després de l'administració, el complex antigen-adjuvant activa els receptors de reconeixement de patrons (PRR, de l'anglès) causant una cascada de reaccions que conduiran a l'activació de la resposta immune adaptativa. Els PRR poden estar localitzats a la superfície de la cèl·lula o ser endocitats i trobar-se a l'endosoma (com els TLR) o en el citoplasma (com els NLR o RLR). Posteriorment, l'antigen és presentat per l'APC com a complex pèptid/MHC, el qual s'uneix al receptor de la cèl·lula T (TCR). Les cèl·lules T es diferencien en T CD8+ o citotòxics (CTL) o T helper CD4+ (Th1 i Th2). Les cèl·lules Th1 i Th2 són les responsables d'induir les cèl·lules B que produeixen anticòsponsitzants i neutralitzants, respectivament. A més, les Th1 poden induir l'estimulació de les T CD8+ (CTL). Imatge extreta de [279].

L'actual desafiament de la indústria farmacèutica és desenvolupar adjuvants que generin resposta Th1, la qual s'ha vist en diversos estudis que és clau per l'eliminació d'infeccions víriques [283], [284]. S'ha suggerit que seria inclús més important aconseguir una combinació d'adjuvants per produir un efecte més potent de la resposta immunitària [285]. Per aquesta raó és fonamental trobar noves estratègies vacunals que indueixin una forta resposta immune tipus Th1 específica contra l'HAV. No obstant, malgrat les grans millores en la nostra comprensió de la immunologia, el desenvolupament de nous adjuvants ha estat retardat. Des del descobriment del primer adjuvant l'any 1926 [286], tan sols s'han aprovat deu adjuvants per a l'ús humà [281], [287]. Cal destacar un adjuvant anomenat CAF01, el qual s'ha vist que pot induir fortament la resposta Th1 en ratolins, porcs i humans. L'adjuvant CAF01 està donant resultats prometedors en vacunes que es troben en assajos clínics contra la tuberculosi [288], HIV [289] i malària [290], demostrant ser un adjuvant segur i eficaç per assajos de vacunació humana.

Als anys 60, es van descobrir els liposomes que són nanovesícules esfèriques amb una membrana composta d'una doble capa de fosfolípids. Des de llavors són els nanotransportadors més comunament utilitzats gràcies a les seves característiques hidrofòbiques i hidrofíliques i la seva capacitat per encapsular molècules ja sigui al seu interior o a la membrana lipofílica. A més, la membrana dels liposomes és molt similar a la membrana cel·lular i per tant, no són rebutjats per l'hoste al ser introduïts [291]. L'alliberació del seu *cargo* pot ser lenta i sostinguda, perllongant el temps de contacte amb el sistema immune [292]. Moltes formulacions de liposomes han sigut aprovades per ser utilitzades com a drogues o vacunes [291]. Més recentment, també s'ha proposat una alternativa a les vacunes clàssiques inactivades que són les vacunes que utilitzen partícules similars a virus (VLPs) que poden estar compostes per una o més proteïnes virals, les quals poden mimetitzar l'estructura del virus i també, poden

contenir una envolta lipídica [293]. Concretament, la vacuna EPAXAL contra l'HAV utilitza una estratègia similar com a sistema d'entrega. Aquesta vacuna es troba adsorbida a la superfície de virosomes d'*Influenza* reconstituïts, els quals reemplacen l'ús d'hidròxid d'alumini com l'adjuvant principal [179].

Sabent que la combinació idònia és replicar la soca HM175-HP en la línia cel·lular FRhK-4, i que la majoria de virions s'alliberen de la cèl·lula en la seva forma quasi-embolcallada amb la membrana de la pròpia cèl·lula, aquest capítol de la tesis planteja explorar el potencial d'aquestes partícules com a nou candidat vacunal. Per fer aquest estudi, es proposa estudiar la immunogenicitat d'aquest nou candidat vacunal en dos models animals, ratolí i porc. El primer per ser un sistema de treball més fàcil i el segon per presentar un sistema immune més proper a l'humà. En el cas de l'estudi amb ratolins, s'ha utilitzat la soca de ratolins BALB/c, una de les més utilitzades en la investigació biomèdica, ja que responen excel·lentment a la immunització. En el cas de l'estudi amb porcs, s'ha utilitzat la soca de porcs Large White x Landrace, la qual és una línia comercial molt utilitzada també en el camp de la investigació.

## 5.2 Resultats

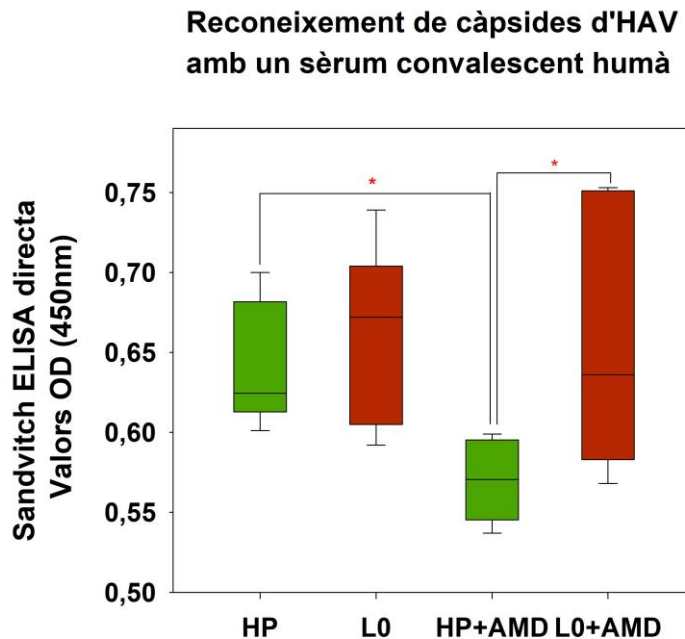
### 5.2.1 Caracterització antigènica de la població HP en comparació amb la població L0

Atès que la població HP podria tenir un plegament de la càpside subtilment diferent respecte a la població L0, aquest capítol de la tesis pretén estudiar l'antigenicitat i immunogenicitat de la població HP com a nou candidat vacunal.

En primer lloc, es va voler comprovar la caracterització antigènica d'ambdues poblacions obtingudes en absència i presència d'AMD. Aquesta caracterització antigènica dels diferents tipus de partícules es va realitzar mitjançant un sandvitx ELISA directe fent ús d'anticossos anti-HAV provinents d'un sèrum convalescent humà. Per la captura antigènica es va fer servir el sèrum no marcat i per la detecció es va usar el mateix sèrum, però marcat amb peroxidasa. A més, com totes les vacunes es produeixen amb càpsides immadures, aquest anàlisi s'ha centrat en partícules nues alliberades de les partícules quasi-embolcallades. En total, s'han testat 3 estocs diferents amb 4 rèpliques cadascun d'ells.

Tot i un lleuger major reconeixement de les càpsides de L0 produïdes en absència d'AMD respecte les càpsides d'HP (**Figura 30**), no hi ha una diferència estadísticament significativa. No obstant, hi ha un reconeixement estadísticament més baix de la soca HP quan les càpsides són produïdes en presència d'AMD. Aquests resultats són probablement deguts als canvis conformacionals de la càpsida d'HAV depenent de les condicions d'inhibició de la síntesis proteica cel·lular en les que es troba. Durant el procés d'adaptació a multiplicar en presència d'AMD, la soca HP va acumular alguns canvis de codons

a la regió de la càpsida. Aquests canvis de codons poden tenir influència en la seva cinètica de traducció i plegament proteic dependent de la presència o no d'AMD, la qual cosa podria explicar la lleugera pèrdua de reconeixement pels anticossos humans contra la soca HP adaptada a créixer en presència d'AMD.



**Figura 30. Reconeixement de càpsides de la població HP i L0, produïdes en absència o presència d'actinomicina D i alliberades dels quasi-embolcalls, per un sèrum convalscent humà. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student,  $p < 0.05$ ) entre poblacions quan s'indica amb un asterisc.**

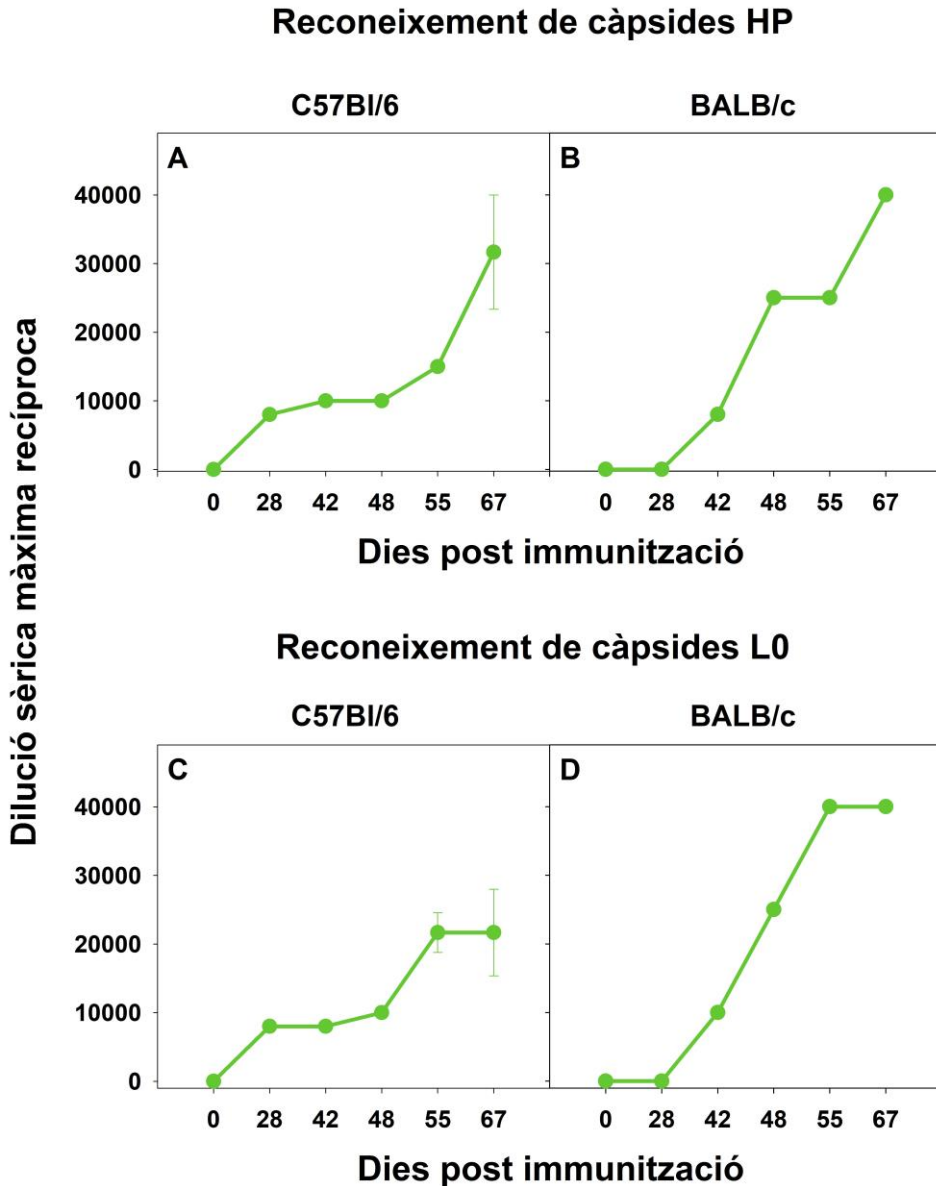
El fet que el reconeixement de la població HP produïda en presència d'AMD sigui inferior és un resultat irrellevant tenint en compte que la producció d'antigen per la vacuna hauria de ser preferiblement produïda en absència d'aquesta droga.

### 5.2.2 Comparativa de la capacitat immunogènica de l'HAV en ratolins C57Bl/6 i BALB/C

Primerament, es va dur a terme un estudi preliminar on es va estudiar la capacitat immunogènica de la soca HP produïts en absència d'AMD en ratolins BALB/c i C57Bl/6. Els immunògens a inocular als ratolins es van produir a la línia cel·lular FRhK-4 seguint el protocol detallat a l'apartat 7.1.5.

Amb aquests inòculs es van inocular 4 ratolins BALB/c i 4 ratolins C57Bl/6. L'administració dels immunògens va ser per via subcutània i contenien aproximadament  $5 \times 10^7$  unitats TCID<sub>50</sub> en 50µl de tampó HEPES, pH 6.0. Les mostres de sèrum es van obtenir després de sagnar els ratolins per el sinus venós submandibular als dies 0, 28, 42, 48, 56 i 67. L'últim dia, els ratolins van ser anestesiats amb isofluorà (*Ecuphar*) i sacrificats mitjançant exsanguinació per punció cardíaca. Es va quantificar el títol d'anticossos IgG totals anti-HAV en les diferents mostres obtingudes mitjançant un assaig d'ELISA sandvitx indirecte segons el protocol detallat a l'apartat 7.10.1.

Amb els resultats obtinguts es va determinar que la immunogenicitat era molt més robusta en el cas dels ratolins BALB/c que en els ratolins C57Bl/6 (**Figura 31**), sobretot en el reconeixement de càpsides de L0 (**Figura 31C i D**). Per aquesta raó, tots els experiments posteriors van ser realitzats utilitzant la soca de ratolins BALB/c.



**Figura 31. Evolució al llarg del temps de la producció d'anticossos IgG en ratolins inoculats amb HP quasi-embolcallat.** A) Producció d'anticossos IgG contra HP reconeixent les càpsides de HP en ratolins C57Bl/6. B) Producció d'anticossos IgG contra HP reconeixent les càpsides de HP en ratolins BALB/6. C) Producció d'anticossos IgG contra HP reconeixent les càpsides de L0 en ratolins C57Bl/6. D) Producció d'anticossos IgG contra HP reconeixent les càpsides de L0 en ratolins BALB/c. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de HP i L0. Les dades es mostren com la mitjana del grup  $\pm$  l'error estàndard. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student,  $p < 0.05$ ) entre les dues soques de ratolins quan les lletres són diferents.



### 5.2.3 Caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en ratolins BALB/C

Posteriorment, es va dur a terme la caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en ratolins BALB/c. Els immunògens a inocular als ratolins es van produir a la línia cel·lular FRhK-4 seguint el protocol detallat a l'apartat 7.1.5. Les partícules nues s'obtenien mitjançant la lisi de les quasi-embolcallades per l'acció del detergent NP40. Cal recordar que la soca L0 (HM175/43c) és un clon derivat de la soca HM175, així com ho és el clon HM175/18f constituent de la vacuna GSK, i la soca HP és un clon derivat de L0.

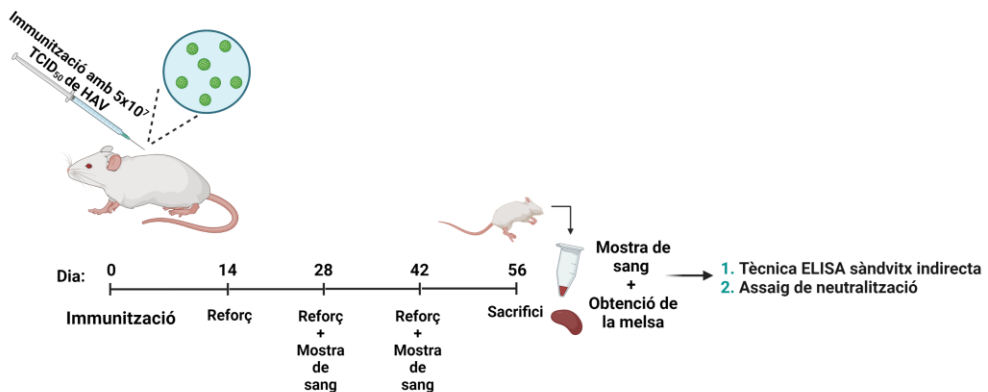
Amb aquests inòculs preparats es van dissenyar 8 grups experimentals que diferien en el producte administrat:

- Grup 1: L0 nu administrat amb l'adjuvant  $\text{Al(OH)}_3$  ( $\text{L0}_n + \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 2: L0 quasi-embolcallat ( $\text{L0}_e - \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 3: HP nu administrat amb  $\text{Al(OH)}_3$  ( $\text{HP}_n + \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 4: HP quasi-embolcallat ( $\text{HP}_e - \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 5: HP nu produït en presència d'AMD i administrat amb  $\text{Al(OH)}_3$  ( $\text{HP}_{nA} + \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 6: HP quasi-embolcallat i produït en presència d'AMD ( $\text{HP}_{eA} - \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 7: vesícules extracel·lulars, és a dir, sobrenedant de cèl·lules no infectades, corresponent al grup control 1.
- Grup 8: ovoalbúmina (OVA), corresponent al grup control 2.

En total es van inocular 96 ratolins femelles de 15 setmanes, repartits a raó de 12 ratolins per grup. A més, també es va inocular un total de 16 ratolins mascles de 15 setmanes d'edat, repartits a raó de 8 ratolins pels grups

experimentals 3 i 5. Per facilitar la manipulació de tants animals, es va procedir a fer l'experiment utilitzant 2 cohorts.

L'administració dels immunògens va ser per via subcutània i els inòculs contenien aproximadament  $5 \times 10^7$  unitats TCID<sub>50</sub> en 50µl de tampó HEPES, pH 6,0. En el cas dels grups experimentals amb partícules nues, l'inòcul es barrejava amb 50µl d'alúmina (Al(OH)<sub>3</sub>), és a dir, l'inòcul total era de 100µl (50µl d'immunogen + 50 µl d'alúmina). El protocol consistia de 4 dosis als dies 0, 14, 28 i 42 (**Figura 32**). Les mostres de sèrum es van obtenir després de sagnar els ratolins per el sinus venós submandibular als dies 0, 28, 42 i 56 post-immunització. L'últim dia, els ratolins van ser anestesiats amb isofluorà (*Ecuphar*) i sacrificats mitjançant exsanguinació per punció cardíaca. Tot el procés d'immunització, obtenció de mostres i sacrifici es va dur a terme en els estabularis de la Unitat d'Experimentació Animal de la Facultat de Farmàcia de la UB (CCiTUB).



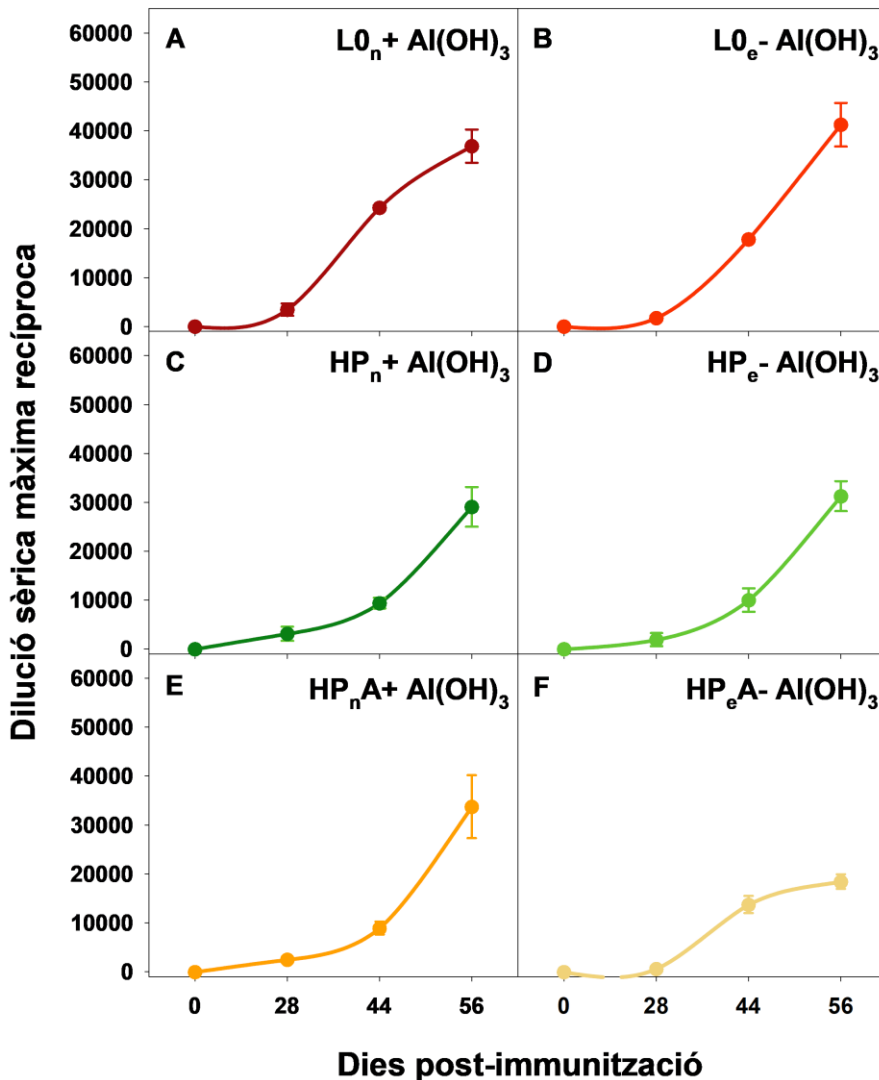
**Figura 32. Esquema il·lustratiu de la immunització de ratolins BALB/c i la presa de mostres.**  
Creat amb BioRender.com

### 5.2.3.1 Resposta d'anticossos IgG totals

El títol d'anticossos IgG totals anti-HAV en les diferents mostres obtingudes va ser quantificat mitjançant un assaig d'ELISA sandvitx indirecte seguint el protocol detallat en l'apartat **7.10.1**. En aquest assaig es feia ús d'un sèrum convalescent humà per la captura i els antígens testats eren càpsides L0 i HP nues produïdes en absència i presència d'AMD, respectivament, i obtingudes de sobrenedants de cèl·lules FRhK-4 infectades, les quals eren posteriorment lisades amb el detergent NP40. Amb els resultats obtinguts es va comparar el potencial immune entre les partícules nues i les quasi-embolcallades, així com també entre les dues poblacions d'HAV utilitzades: L0 i HP.

La comparació de les cinètiques de producció d'IgG capaces de reconèixer les càpsides de L0 (clon HM175/43c de la soca HM175 molt semblant al clon HM175/18f constituent de la vacuna GSK) al llarg del temps mostra un patró similar amb totes les formulacions vacunals (**Figura 33**). Tot i que el reconeixement de les càpsides de L0 és inferior amb els sèrums de ratolins inoculats amb la població HP respecte els inoculats amb L0, no s'observen diferències estadísticament significatives (**Figura 33A vs C i B vs D**). Aquest reconeixement lleugerament inferior de la L0 per part dels sèrums de ratolins inoculats amb la població HP no és inesperada donat que es tracte del reconeixement d'un antigen heteròleg en la tècnica d'ELISA. Aquesta diferència no es detecta quan els sèrums de ratolins inoculats amb la població HP són testats contra les càpsides homòlogues, és a dir, càpsides de HP (**Figura 34**).

### Reconeixement de càpsides de L0

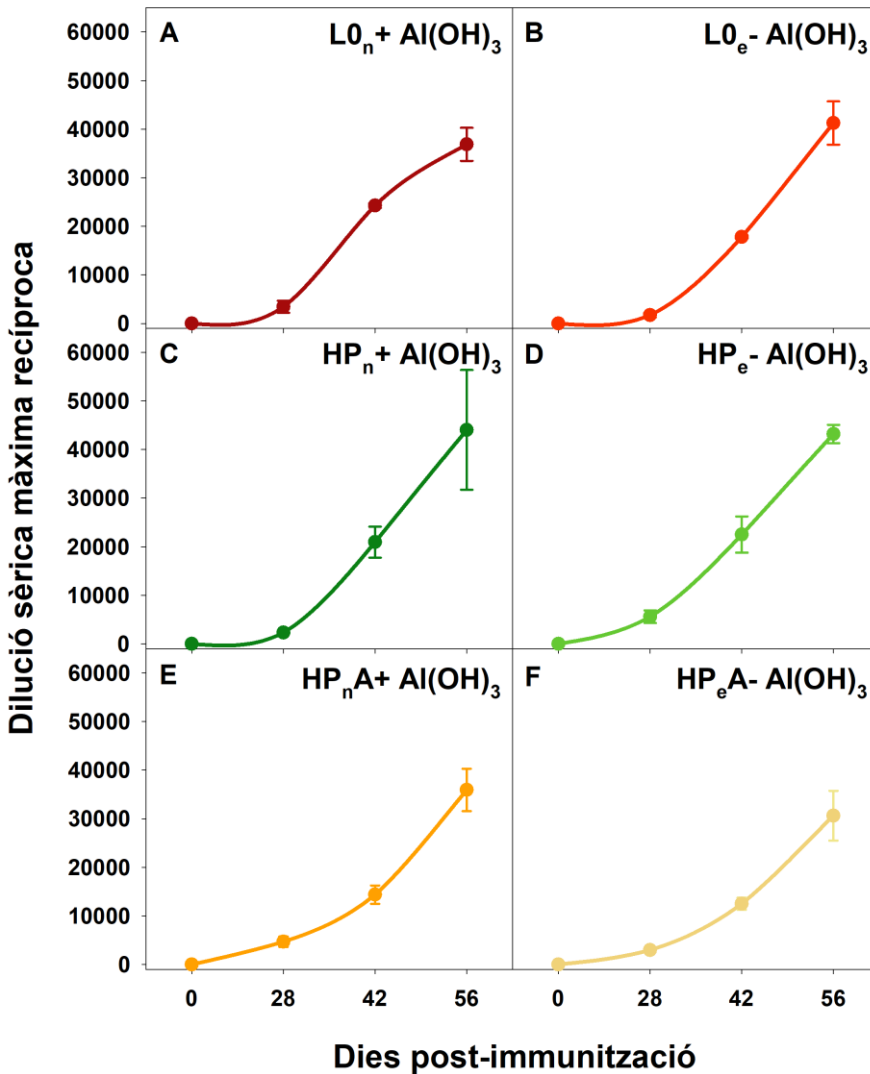


**Figura 33.** Evolució al llarg del temps de la producció d'anticossos IgG que reconeixen les càpsides de L0. A) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb L0<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>. B) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb L0<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>. C) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>. D) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>. E) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb HP<sub>n</sub>A + Al(OH)<sub>3</sub>. F) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb HP<sub>e</sub>A - Al(OH)<sub>3</sub>. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de L0. Les dades es mostren com la mitjana del grup ± l'error estàndard.

Per altra banda, si s'analitza la immunogenicitat de les partícules nues amb adjuvant respecte a les partícules quasi-embolcallades, és destacable que els grups experimentals amb partícules quasi-embolcallades tenen una producció d'anticossos lleugerament més alta al dia 56 post-immunització, sobretot en el cas de la L0, però sense ser un augment estadísticament significatiu (**Figura 33A vs B i C vs D**). Per tant, aquests resultats indiquen que els quatre grups experimentals de ratolins estan produint nivells semblants d'anticossos contra ambdós tipus de partícules, i que les quasi-embolcallades podrien ser bons adjuvants naturals per potenciar la resposta immune.

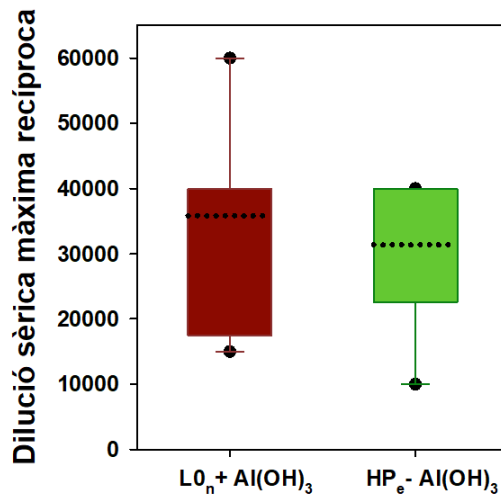
Cal destacar que no hi ha canvis significatius en la inducció d'anticossos que reconeixen les càpsides de L0 en els ratolins inoculats amb HP produït en presència d'AMD (**Figura 33E i F**). Atès que a la indústria farmacèutica li interessa crear vacunes amb només els ingredients necessaris, s'ha decidit no afegir aquests grups experimentals en posteriors cohorts d'immunització de ratolins i porcs.

### Reconeixement de càpsides homòlogues



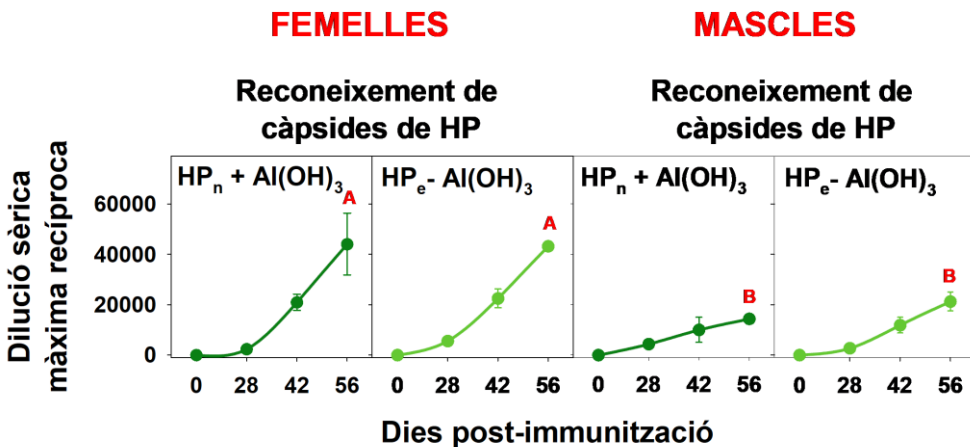
**Figura 34. Evolució al llarg del temps de la producció d'anticossos IgG que reconeixen les càpsides homòlogues.** A) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb  $L0_n + Al(OH)_3$ . B) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb  $L0_e - Al(OH)_3$ . C) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb  $HP_n + Al(OH)_3$ . D) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb  $HP_e - Al(OH)_3$ . E) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb  $HP_nA + Al(OH)_3$ . F) Producció d'anticossos IgG en ratolins femella inoculats amb  $HP_eA - Al(OH)_3$ . La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de  $L0$  i  $HP$ . Les dades es mostren com la mitjana del grup  $\pm$  l'error estàndard.

Específicament, comparant el sèrum provinent de ratolins inoculats amb l'antigen  $L0_n$ , administrat amb alumina com adjuvant, i el sèrum provinent de ratolins inoculats amb l'antigen  $HP_e$ , es troba que l'antigen  $HP_e$  té uns títols d'anticossos anti- $L0$  lleugerament més baixos, tot i que no estadísticament significatius (**Figura 35**). Tenint en compte que els anticossos contra  $HP_e$  van ser induïts en absència de cap adjuvant addicional, els resultats són molt prometedors, perquè el preparat  $HP_e$  mostra un comportament comparable amb una soca equivalent a la vacuna actual de GSK. A més, la lleugera pèrdua de potència de reconeixement es podria veure compensada amb la producció 5 vegades superior de la soca  $HP$  en respecte a la soca  $L0$  i amb una major taxa de replicació en un temps menor (veure resultats capítol 2).



**Figura 35.** Títols de les respostes d'IgG totals dels sèrums provinents de ratolins inoculats amb  $L0_n + Al(OH)_3$  i  $HP_e - Al(OH)_3$  al dia de sacrifici. Les línies negres discontinues indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament. Les línies contínues representen el percentil del 50% i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament.

En quant als ratolins mascles, els estudis d'immunogenicitat només es van fer entre les poblacions HP, ja que és la que interessava com a proposta de candidata vacunal. Els resultats mostren que la resposta d'anticossos anti-HP és subtilment superior amb sèrums que provenen de ratolins inoculats amb HP<sub>e</sub>, encara que no hi ha diferències estadísticament significatives (**Figura 36**).



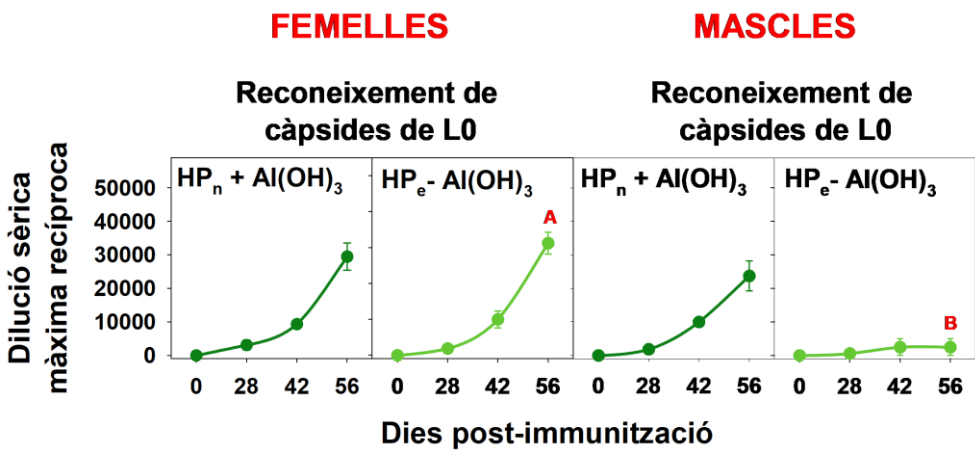
B

	Producte vacunal	Mitjana dilució sèrica màxima recíproca	Positius /total
Femelles	HP <sub>n</sub> + Al(OH) <sub>3</sub>	44063	12/12
	HP <sub>e</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	43214	11/11
Mascles	HP <sub>n</sub> + Al(OH) <sub>3</sub>	14375	5/8
	HP <sub>e</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	21250	4/8

**Figura 36. Evolució al llarg del temps de la producció d'anticossos IgG totals reconeixent les càpsides d'HP en ratolins femelles i mascles inoculats amb HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub> i HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>.** A) Evolució al llarg del temps de la producció IgG totals. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de HP. B) Taula resum de la mitjana de la dilució sèrica màxima recíproca i els sèrums positius respecte als totals al dia 56 p.i. Les dades es mostren com la mitjana del grup ± l'error estàndard. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student, p<0.05) entre mascles i femelles quan les lletres són diferents.



En canvi, inesperadament es veu tot el contrari en vers al reconeixement de L0, en el cas concret dels mascles (**Figura 37**). Aquest reconeixement més baix de L0 a mascles, es podria explicar pel fet que al ser un reconeixement heteròleg es necessitaria una major concentració d'IgGs que es donaria en femelles, però no en mascles sense l'addició d'un adjuvant. Per tant, podem concloure que els ratolins BALB/C mascles no són tan bon model com els ratolins femelles per estudiar la immunogenicitat.



B

	Producte vacunal	Mitjana dilució sèrica màxima recíproca	Positius /total
Femelles	HP <sub>n</sub> + Al(OH) <sub>3</sub>	29545	12/12
	HP <sub>e</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	31250	11/11
Mascles	HP <sub>n</sub> + Al(OH) <sub>3</sub>	23750	7/8
	HP <sub>e</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	2500	2/8

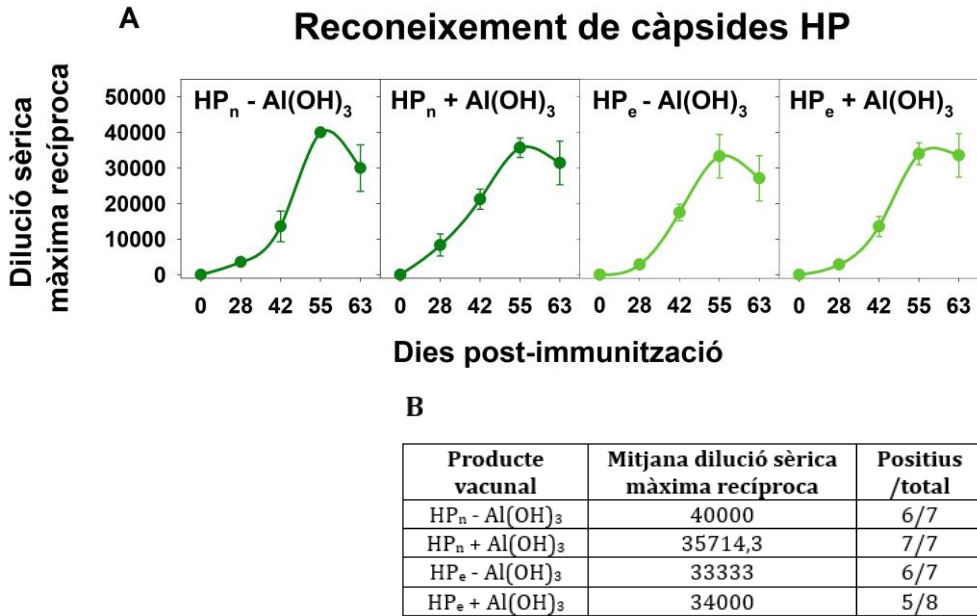
**Figura 37. Evolució al llarg del temps de la producció d'anticossos IgG totals reconeixent les càpsides de L0 en ratolins femelles i mascles inoculats amb HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub> i HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>.** A) Evolució al llarg del temps de la producció IgG totals. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de L0. B) Taula resum de la mitjana de la dilució sèrica màxima recíproca i els sèrums positius respecte als totals al dia 56 p.i. Les dades es mostren com la mitjana del grup ± l'error estàndard. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student, p<0.05) entre mascles i femelles quan les lletres són diferents.

Finalment, vàrem treballar una última cohort d'immunitzacions de ratolins femella per testar la immunogenicitat generada per un preparat vacunal que combina la partícula quasi-embolcallada d'HP amb la presència d'alúmina com adjuvant. Es van dissenyar 5 grups d'experimentació:

- Grup 1: HP nu sense  $\text{Al(OH)}_3$  ( $\text{HP}_n - \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 2: HP nu administrat amb  $\text{Al(OH)}_3$  ( $\text{HP}_n + \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 3: HP quasi-embolcallat sense  $\text{Al(OH)}_3$  ( $\text{HP}_e - \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 4: HP quasi-embolcallat i administrat amb  $\text{Al(OH)}_3$  ( $\text{HP}_e + \text{Al(OH)}_3$ ).
- Grup 5: vesícules extracel·lulars, és a dir, sobrenedant de cèl·lules no infectades, com a grup control.

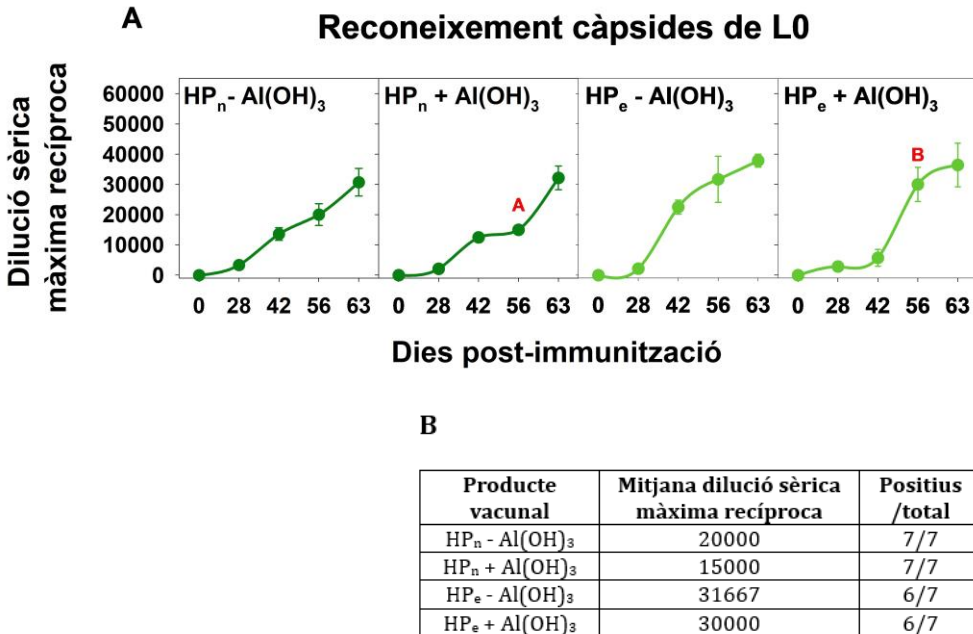
Es van inocular un total de 35 ratolins femelles de 15 setmanes, repartits en 7 ratolins per cada un dels grups d'immunògens. En aquesta cohort, la immunització de ratolins va ser exactament igual a l'anterior, però es va allargar el sacrifici fins al dia 63, per tal de veure si l'eficiència de producció d'anticossos augmentava.

El reconeixement d'anticossos que reconeixen càpsides de HP és similar per tots els sèrums (**Figura 38**). Sorprenentment, els resultats mostren que l'alúmina no potencia la producció d'anticossos. A més, els resultats mostren que allargar el sacrifici fins al dia 63, no suposa una producció d'anticossos major.



**Figura 38.** Evolució al llarg del temps de la producció d'anticossos IgG totals reconeixent les càpsides de HP en ratolins femelles inoculats amb HP<sub>n</sub> i HP<sub>e</sub> en presència o absència d'alúmina. A) Evolució al llarg del temps de la producció IgG totals. B) Taula resum de la mitjana de la dilució sèrica màxima recíproca i els sèrums positius respecte als totals al dia 56 p.i. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de HP. Les dades es mostren com la mitjana del grup ± l'error estàndard.

El reconeixement de L0 corrobora que l'alúmina no potencia la producció d'anticossos contra el virus (**Figura 39**). Tanmateix, s'observa que allargar el dia de sacrifici indueix més producció d'anticossos capaços de reconèixer L0, contràriament al que s'observa amb el reconeixement de HP (**Figura 38**). A més, destaca la resposta més primerenca dels grups inoculats amb virus quasi-embolcallat respecte als inoculats amb virus nus, tot i acabar tenint una resposta d'anticossos similar. Aquests resultats recalquen de nou la bona immunogenicitat que generen les partícules quasi-embolcallades.



**Figura 39. Evolució al llarg del temps de la producció d'anticossos IgG totals reconeixent les càpsides de L0 en ratolins femelles inoculats amb HP<sub>n</sub> i HP<sub>e</sub> en presència o absència d'alúmina.** A) Evolució al llarg del temps de la producció IgG totals. B) Taula resum de la mitjana de la dilució sèrica màxima recíproca i els sèrums positius respecte als totals al dia 56 p.i. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de L0. Les dades es mostren com la mitjana del grup  $\pm$  l'error estàndard. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student,  $p < 0.05$ ) al dia 56 p.i. entre grups experimentals quan les lletres majúscules són diferents.

Cal emfatitzar que no s'observen diferències en la producció d'anticossos IgG totals entre els grups experimentals immunitzats amb virus quasi-embolcallat en absència o presència d'Al(OH)<sub>3</sub> (**Figura 38 i 39**). Aquesta informació és molt destacable i proposa que la combinació de les dues condicions juntes no indueix més fortament la resposta immune en ratolins i doncs, immunitzant tan sols amb la partícules quasi-embolcallades en absència d'adjuvant es podria obtenir una immunogenicitat molt bona. Aquestes dades serien rellevants per generar una nova estratègia vacunal segons les directrius de la OMS, on recalquen la importància de generar vacunes el més naturals possible.

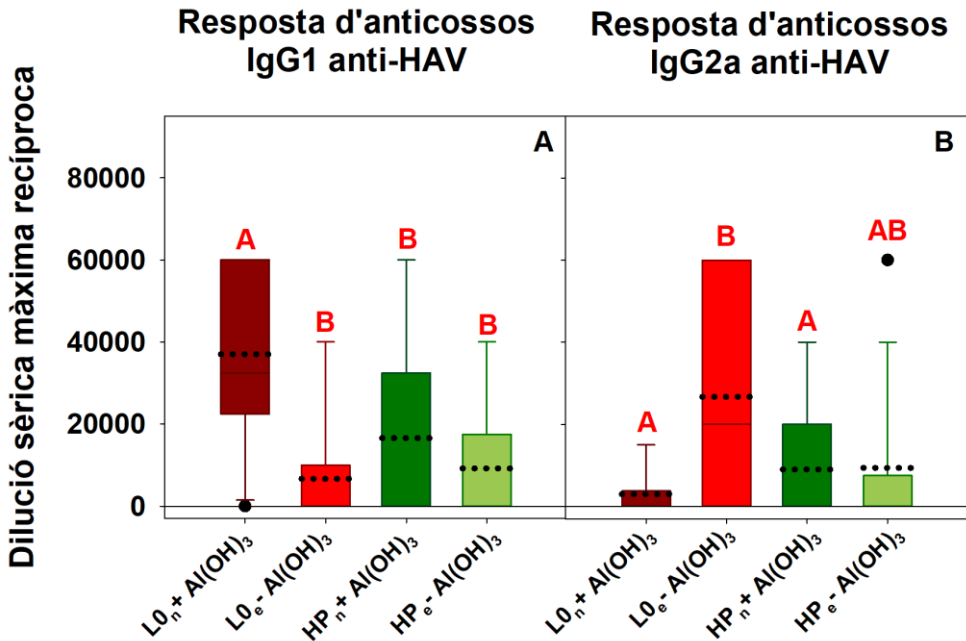
### 5.2.3.2 Caracterització de la resposta d'IgGs: resposta d' IgG1 i IgG2a

El títol d'anticossos IgG1 i IgG2a anti-HAV en les diferents mostres obtingudes va ser quantificat mitjançant un assaig d'ELISA sandvitx indirecte seguint els passos descrits en l'apartat 7.10.2. En aquest assaig es feia ús d'un sèrum convalescent humà per la captura i els antígens testats eren càpsides de L0 o HP nues produïdes en absència i presència d'AMD, respectivament. Els sèrums van ser testats reconeixent càpsides homòlogues, és a dir, anti-L0 contra L0 i anti-HP contra HP.

Els anticossos IgG1 i IgG2a són marcadors de resposta de limfòcits Th2 i Th1, respectivament. En aquest apartat es pretén estudiar la naturalesa de les IgG totals mitjançant l'anàlisi de la proporció d'anticossos IgG1 i IgG2a entre els diferents grups de ratolins inoculats amb partícules nues i l'adjuvant hidròxid d'alumini o amb partícules quasi-embolcallades sense adjuvant. És important esmentar que com hi havia algun grup repetit en les diferents cohorts de ratolins, assumint que les immunitzacions s'havien fet sota les mateixes condicions, es va considerar oportú realitzar l'anàlisi reunint els resultats de totes les cohorts per facilitar-ne la seva interpretació.

Primerament, comparant els títols d'anticossos IgG1 entre els ratolins inoculats amb L0, aquests mostren una clara diferència en la proporció d'anticossos (**Figura 40A**). Els ratolins inoculats amb L0<sub>n</sub> i Al(OH)<sub>3</sub> produeixen significativament més anticossos IgG1 que els grups inoculats amb L0<sub>e</sub> sense Al(OH)<sub>3</sub>. Aquests resultats concorden amb el fet que l'Al(OH)<sub>3</sub> activa fortament la producció d'IgG1 [279], [286]. Aquesta tendència també s'observa en els ratolins inoculats amb HP, encara que en aquest cas les diferències no són significatives. Al contrari, la resposta d'anticossos IgG2a és significativament

més alta en ratolins inoculats amb  $L0_e$  que no pas en ratolins inoculats amb  $L0_n$  (**Figura 40B**). Aquests resultats són molt rellevants ja que, d'acord amb el que s'ha comentat en els antecedents, és necessari crear nous adjuvants que estimulin la resposta Th1, la qual va dirigida als patògens intracel·lulars com els virus [279], [281], [287]. No obstant, aquest patró no s'observa tan clar entre els grups experimentals  $HP_n$  i  $HP_e$ , els quals tenen una producció d'anticossos IgG2a similar. Aquesta observació podria ser explicada pel fet que les càpsides d'HP tenen major afinitat per ALIX tal i com s'explica en el capítol 1, i en conseqüència, estarien més fortament unides a la membrana, el que provoca que les partícules quasi-embolcallades no siguin lisades completament amb l'acció del detergent NP40 (protocol detallat a l'apartat 7.1.5). Per tant, l'immunogen  $HP_n$  inoculat estaria format per una barreja de partícules en fases intermèdies entre quasi-embolcallades i nues. De totes maneres, esperaríem cert increment de resposta d'anticossos IgG2a en el grup experimental  $HP_e$  i, en canvi, no s'observa. Aquest fet no passa tant en el cas dels antígens  $L0_n$  i  $L0_e$ , ja que les càpsides no estarien tan estretament unides al quasi-embolcall.



**Figura 40.** Títols de les respostes específiques IgG1 i IgG2a dels sèrums provinents de ratolins femella inoculats amb  $L0_n + Al(OH)_3$ ,  $L0_e - Al(OH)_3$ ,  $HP_n + Al(OH)_3$ ,  $HP_e - Al(OH)_3$  al dia 56 post-inoculació. A) Resposta d'anticossos IgG1. B) Resposta d'anticossos contra IgG2a. La producció d'anticossos es va mesurar com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de L0 i HP. Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament. Les línies contínues representen el percentil del 50% i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student,  $p < 0.05$ ) entre grups experimentals per una mateixa resposta d'anticossos quan les lletres són diferents.

En segon lloc, una altra manera d'extreure resultats d'aquests assajos és estimant la proporció d'anticossos entre les respostes d'IgG1 i IgG2a dins de cada grup experimental. Tal i com s'ha esmentat, els ratolins inoculats amb hidròxid d'alumini, sobretot en el cas de la població L0, tenen una producció d'IgG1 més alta que d'IgG2a, mentre que els inoculats amb partícules quasi-embolcallades tenen una producció més elevada d'anticossos IgG2a. Aquestes dades també s'observen comparant les proporcions d'anticossos (**Taula 4**). En concret, la resposta IgG2a en  $L0_e$  és gairebé 10 vegades més gran que en  $L0_n$ , mentre que l'augment en el cas de la població HP no és tan considerable. Aquests

resultats són totalment coherents amb el fet que l'hidròxid d'alumini activa més la resposta Th2, mentre que les partícules quasi-embolcallades activarien més la resposta Th1 [286], [287].

**Taula 4. Anàlisi quantitatiu de les respostes IgG1 i IgG2a.** La producció d'anticossos s'expressa com a la mitjana de la màxima dilució sèrica de cada ratolí que reconeix les càpsides de LO o HP segons l'origen del sèrum.

Producte vacunal	Dilució sèrica màxima recíproca IgG1	Dilució sèrica màxima recíproca IgG2a	Valor p	Mitjana de la proporció IgG1/IgG2a	Mitjana de la proporció IgG2a/IgG1	Valor p
LO <sub>n</sub> + Al(OH) <sub>3</sub>	37000	3000	<0.001	32000.4	0.22	0.001
LO <sub>e</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	6667	26667	0.18	0.67	200000.7	0.05
HP <sub>n</sub> + Al(OH) <sub>3</sub>	20556	9445	0.13	13437.48	6250.5	0.12
HP <sub>e</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	11843	13056	0.85	4219.43	4091.6	0.91

Tot plegat, aquestes observacions aporten informació molt rellevant per una nova estratègia vacunal que incorpori partícules quasi-embolcallades amb capacitat d'activar la resposta de limfòcits Th1.

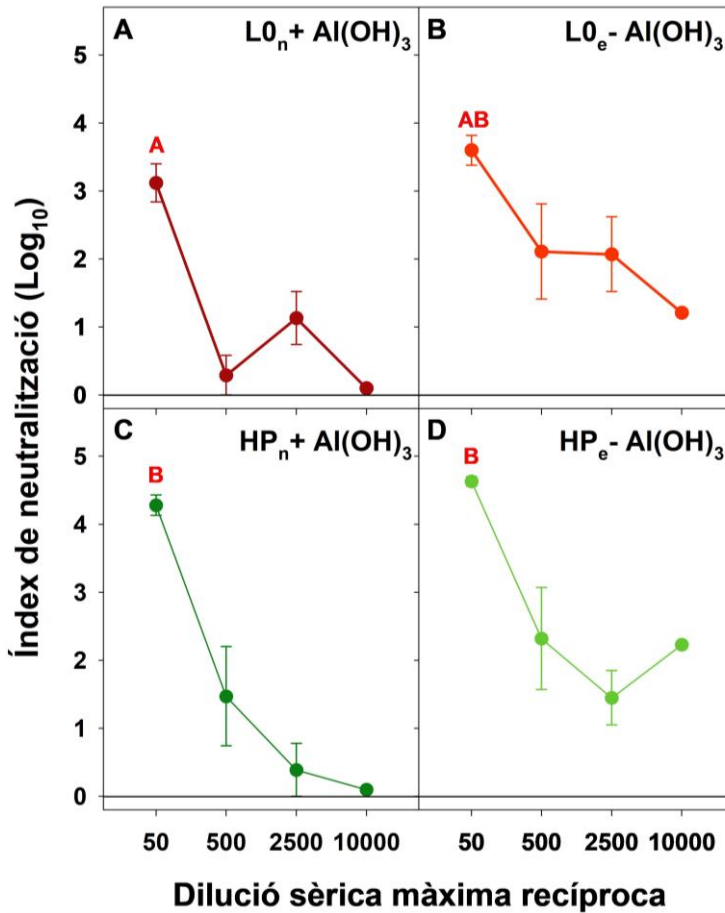
### 5.2.3.3 Neutralització de la infectivitat *in vitro*.

La inducció d'anticossos neutralitzants és un enfoc més fiable per estimar la validesa dels candidats vacunals. La tècnica de neutralització de la infectivitat *in vitro* consisteix en incubar els sèrums a testar, així com també un sèrum no immune amb l'HAV i posteriorment, realitzar una quantificació dels virus infecciosos mitjançant l'assaig de TCID<sub>50</sub>. Els títols obtinguts dels sèrums immunes es comparen amb els no immune i així es pot determinar si els sèrums immunes fan caure el títol víric infecciosos. El protocol detallat es troba en l'apartat **7.10.3**.



Tenint en compte que els resultats d'IgGs anti-HAV van mostrar que durant els primers dies després de la immunització hi havia títols bastant baixos, es va decidir que les proves de neutralització només es realitzarien amb mostres de sèrum del dia 56 després de la immunització. A més, tot i haver estat analitzats, els resultats de neutralització dels grups d'experimentació on s'immunitzava HP<sub>n</sub> i HP<sub>e</sub> produïts en presència d'AMD, no es mostren per tal de simplificar els resultats. Igual que passa en els assajos de caracterització antigènica i en els títols d'IgGs, no hi ha cap avantatge d'aquests dos grups vacunals enfront als altres en la prova de neutralització.

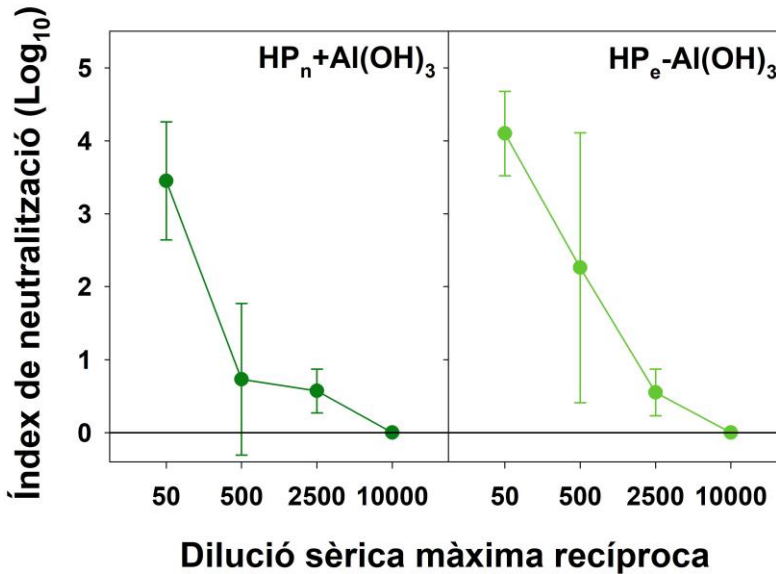
Primerament, es va realitzar una sèrie d'assajos de neutralització amb tres mostres aleatòries de cada grup d'experimentació per tal de determinar quina era la dilució més òptima per a la prova. Per realitzar-ho, es va fer un banc de dilucions dels sèrums de les mostres escollides que anava de la 1/50 a 1/10,000, i es van incubar amb un total de 10<sup>5</sup> unitats TCID<sub>50</sub> de l'HAV. Amb les dades obtingudes, vam identificar que hi havia poca capacitat de neutralització de l'HAV en els sèrums més diluïts (**Figura 41**) i a mesura que concentràvem més el sèrum, augmentava aquesta capacitat de neutralització de l'HAV.



**Figura 41.** Neutralització de la infectivitat de la població HAV homòloga per sèrums de ratolins femella inoculats amb els antigens L0<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, L0<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub> i HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>. La capacitat de neutralització és expressada com el logaritme decimal de la reducció del títol respecte el control negatiu ( $\text{Log}_{10} N_0 - N_t$  on  $N_0$  és el títol enfront del sèrum no immune i  $N_t$  el títol enfront del sèrum immune), anomenat índex de neutralització (IN). Les dades es mostren com la mitjana del grup  $\pm$  l'error estàndard. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student,  $p < 0.05$ ) al dia 56 p.i entre poblacions quan les lletres majúscules són diferents.

Adicionalment, aquesta prova també ens va permetre veure que els sèrums dels grups inoculats amb partícules quasi-embolcallades (**Figura 41B i D**) eren capaços de neutralitzar millor la infectivitat de l'HAV a dilucions més altes en comparació amb els dels grups inoculats amb partícules nues i l'adjuvant Al(OH)<sub>3</sub> (**Figura 41A i C**), reforçant la idea de que les partícules quasi-

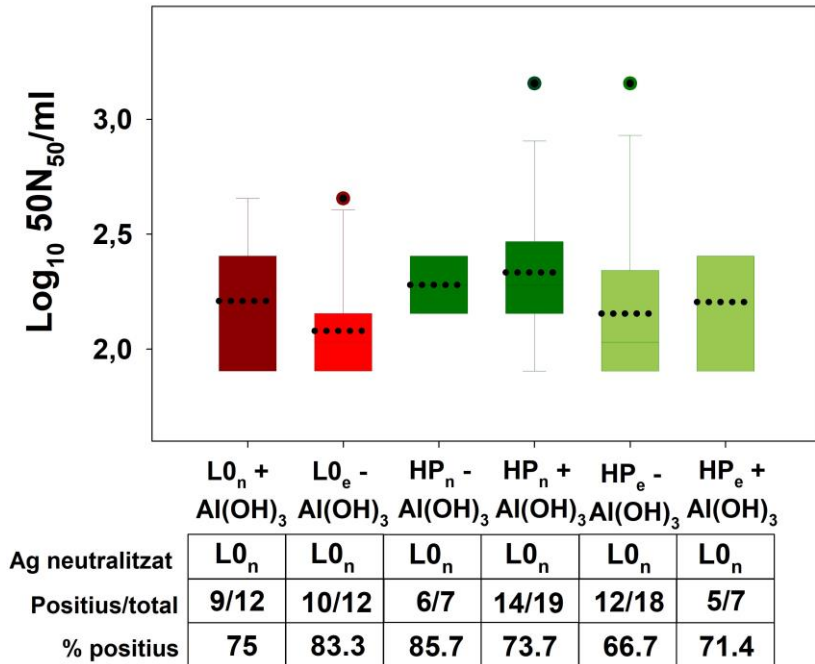
embolcallades estimulen igual o millor el sistema immune. Aquesta tendència també s'observa en el grup d'experimentació de ratolins mascles (**Figura 42**).



**Figura 42. Neutralització de la infectivitat de la població HP per sèrums de ratolins mascle inoculats amb els antigens HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub> i HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>.** La capacitat de neutralització és expressada com el logaritme decimal de la reducció del títol del control negatiu ( $\text{Log}_{10} N_0 - N_t$  on  $N_0$  és el títol enfront del sèrum no immune i  $N_t$  el títol enfront del sèrum immune), anomenat índex de neutralització (IN). Les dades es mostren com la mitjana del grup  $\pm$  l'error estàndard.

A partir d'aquesta prova, vam establir les dilucions 1/50 i 1/10 pel nostre assaig. La capacitat de neutralització es va expressar com el  $\text{Log}_{10}$  del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 50% de  $1 \times 10^5$  unitats  $\text{TCID}_{50}$  en un 50% de les rèpliques ( $\text{Log}_{10} 50N_{50}$  U/ml). És a dir, el  $\text{Log}_{10}$  del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar 50,000 unitats  $\text{TCID}_{50}$  en un 50% de les rèpliques analitzades. De nou, es va considerar oportú realitzar l'anàlisi reunint els resultats de totes les cohorts per facilitar-ne la seva interpretació.

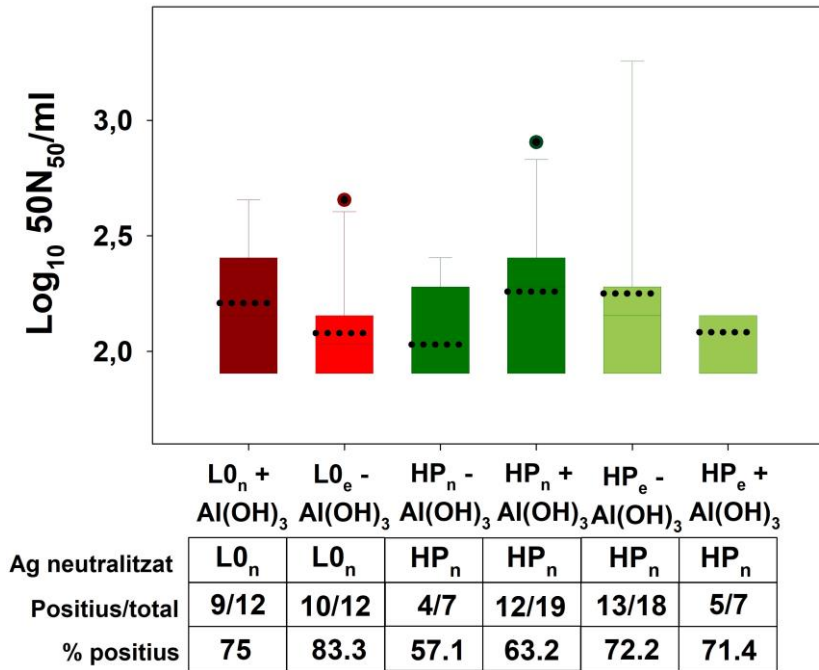
En els resultats obtinguts no s’observen clares diferències entre els grups inoculats amb partícules nues o quasi-embolcallades ni per L0 ni per HP neutralitzant la infectivitat de la població L0 (**Figura 43**). Tampoc s’observen si comparem els grups inoculats amb L0 i HP entre ells.



**Figura 43. Neutralització d’infectivitat de la població L0 per sèrums de ratolins inoculats amb els antigens L0<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, L0<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>n</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub> i HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>.** La neutralització d’infectivitat es va mesurar com Log<sub>10</sub> del nombre d’unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 50% de 1x10<sup>5</sup> unitats TCID<sub>50</sub> en un 50% de les rèpliques (Log<sub>10</sub> 50N<sub>50</sub> U/ml). Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament. Les línies contínues representen el percentil del 50% i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament. L’antigen neutralitzat, la proporció de positius respecte el total i el percentatge de positius s’indiquen a sota del gràfic.

Sorprenentment, no hi ha diferències estadísticament significatives entre cap dels grups experimentals. Tots ells presenten una neutralització semblant a la resta de grups, sense mostrar un increment en el cas del preparat vacunal que

combina la partícula quasi-embolcallada i l'ús de l'hidròxid d'alumini. Aquests mateixos resultats s'observen també quan es neutralitza la infectivitat de la població homòloga en cada cas (**Figura 44**).



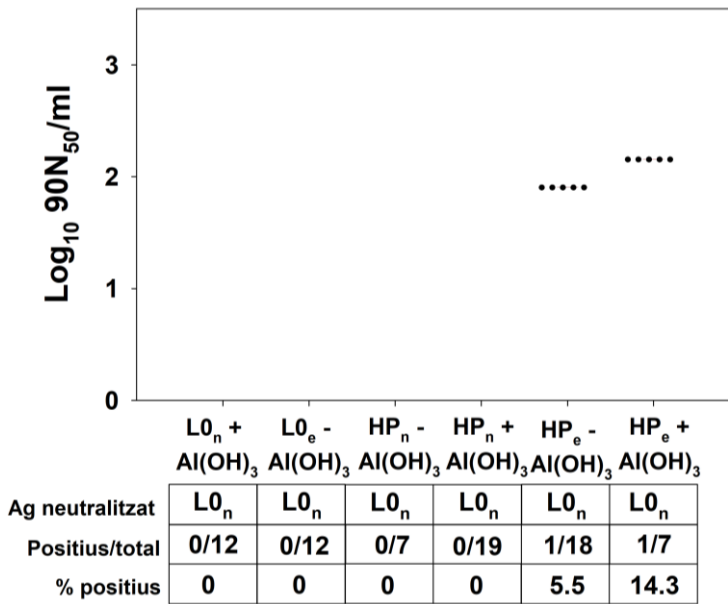
**Figura 44. Neutralització d'infectivitat de la població homòloga per sèrums de ratolins inoculats amb els antígens  $L0_n + Al(OH)_3$ ,  $L0_e - Al(OH)_3$ ,  $HP_n - Al(OH)_3$ ,  $HP_n + Al(OH)_3$ ,  $HP_e - Al(OH)_3$  i  $HP_e + Al(OH)_3$ . La neutralització d'infectivitat es va mesurar com  $Log_{10}$  del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 50% de  $1 \times 10^5$  unitats TCID<sub>50</sub> en un 50% de les rèpliques ( $Log_{10}$  50N<sub>50</sub> U/ml). Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament. Les línies contínues representen el percentil del 50% i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament. L'antigen neutralitzat, la proporció de positius respecte el total i el percentatge de positius s'indiquen a sota del gràfic.**

En conjunt, aquestes dades suggereixen que les partícules quasi-embolcallades podrien representar una vacuna alternativa més natural amb similars propietats immunogèniques.

Per intentar trobar diferències entre els diferents grups vacunals i així obtenir més informació de les nostres dades, es va decidir calcular la capacitat de neutralització expressant-la com a  $\text{Log}_{10} 90\text{N}_{50}$  U/ml, és a dir, calcular el  $\text{Log}_{10}$  del nombre d'unitats per ml de sèrum capaços de neutralitzar 90,000 unitats  $\text{TCID}_{50}$  en un 50% de les rèpliques.

Aquests càlculs ens van permetre veure que només en els preparats vacunals d' $\text{HP}_e - \text{Al}(\text{OH})_3$  i  $\text{HP}_e + \text{Al}(\text{OH})_3$  hi havia ratolins capaços d'arribar a neutralitzar *in vitro* el 90% d'unitats  $\text{TCID}_{50}$  en el 50% de les rèpliques (**Figura 45**). Els resultats són encoratjadors, encara que en ambdós casos només un de tots els ratolins immunitzats n'és capaç.

Amb tot el conjunt de les nostres dades de neutralització de la infectivitat *in vitro* es podria suggerir que l'hidròxid d'alumini no seria tan bo potenciant la resposta immune i per tant, evidencia de nou la bona estratègia que seria utilitzar les partícules quasi-embolcallades, ja que seria una vacuna més natural i igual o més immunogènica que les que utilitzen hidròxid d'alumini.



**Figura 45. Neutralització d'infectivitat de la població L0 per sèrums de ratolins inoculats amb els antigens L0<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, L0<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>n</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub> i HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>.** La neutralització d'infectivitat s'expressa com Log<sub>10</sub> del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 90% de 1x10<sup>5</sup> unitats TCID<sub>50</sub> en un 50% de les rèpliques (Log<sub>10</sub> 90N<sub>50</sub> U/ml.) Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. L'antigen neutralitzat, la proporció de positius respecte el total i el percentatge de positius s'indiquen a sota del gràfic.

### 5.2.4 Caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en porcs Landrace x Large White

La immunització de porcs requereix de títols d'immunogens més alts que la de ratolins degut a la seva major mida. Es van produir estocs d'aproximadament 8 Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml a partir de sobrenedants de cèl·lules infectades. En aquest cas, la immunització de porcs es va analitzar només amb la població HP, donat que és el nou candidat vacunal. A més, es va afegir un grup de porcs, on es pogués analitzar la immunogenicitat generada per un preparat vacunal que en comptes d'afegir-li l'adjuvant Al(OH)<sub>3</sub>, se li afegís CAF01, un adjuvant experimental seleccionat degut a les seves habilitats d'induir la resposta Th1 en

ratolins, porcs i humans [275]. Per altra banda, es va utilitzar la vacuna HAVRIX com a control positiu, i un determinant immunodominant del virus de la pesta porcina africana (ASFV) anomenat p32 [294] com a control negatiu. Prèviament, en el laboratori de Sanitat Animal d'IRTA-CReSA, s'havien induït fortes respostes d'anticossos anti-ASFV quan s'inoculaven porcs amb dues dosis de 50µg de la proteïna recombinant p32, en presència d'adjuvant CAF01® (manuscrit en preparació). Per aquest motiu, s'ha utilitzat la proteïna p32 com a control negatiu i alhora, com a control intern per garantir que l'experiment d'immunització del porc funciona correctament.

Així doncs, es van dissenyar 6 grups experimentals:

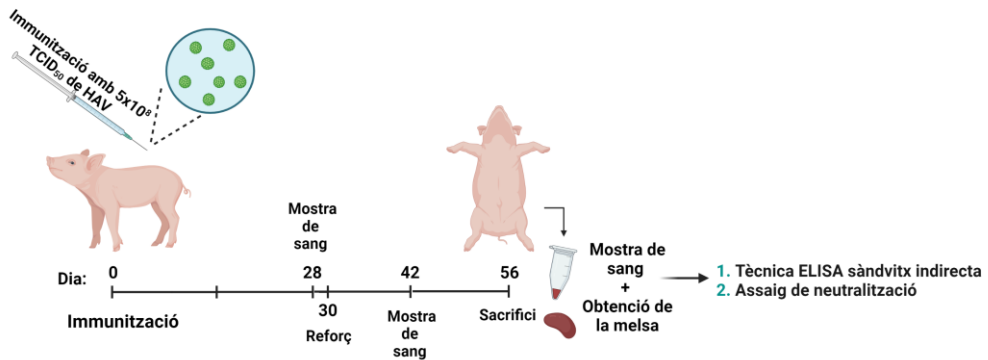
- Grup 1: HP quasi-embolcallat sense adjuvant (HP<sub>e</sub>).
- Grup 2: HP nu sense adjuvant (HP<sub>n</sub>).
- Grup 3: HP quasi-embolcallat amb l'adjuvant Al(OH)<sub>3</sub> (HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>).
- Grup 4: HP quasi-embolcallat amb l'adjuvant CAF01® (HP<sub>e</sub> + CAF01).
- Grup 5: vacuna comercial HAVRIX-1440 (1440 unitats d'ELISA per dosis amb l'adjuvant Al(OH)<sub>3</sub>) (HAVRIX), corresponent al grup control positiu.
- Grup 6: 50µg de p32 recombinant administrat amb l'adjuvant CAF01® (p32 + CAF01), corresponent al grup control negatiu.

En total, es van inocular 6 porcs de 8 setmanes per cada un dels grups d'immunògens a raó de 3 femelles i 3 mascles. No obstant, no es va fer una separació entre ells per analitzar els diferents resultats, ja que no diferien entre ells.

L'administració dels immunògens va ser per via subcutània i els inòculs contenien  $2,5 \times 10^8$  unitats TCID<sub>50</sub> en 2ml de tampó HEPES, pH 6,0. En el cas dels grups experimentals amb partícules nues, es barrejaven amb 50µgr d'adjuvant



Al(OH)<sub>3</sub> o CAF01®. Aquest inòcul era reforçat amb 1 dosi més el dia 30 després de la inoculació inicial (**Figura 46**). Les mostres de sèrum es van obtenir després de sagnar els porcs als dies 0, 28, 42 i 56 post-immunització. L'últim dia, els porcs eren sacrificats. Tot el procés d'immunització, obtenció de mostres i sacrifici es va dur a terme en el Departament de Seguretat Animal d'IRTA-CReSA.

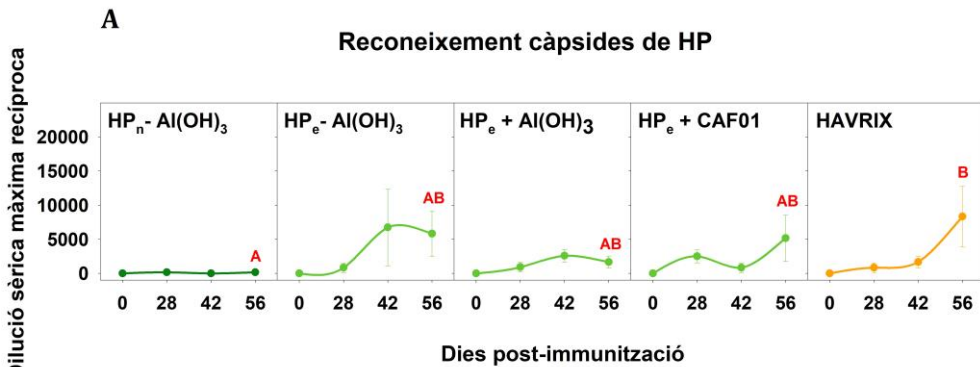


**Figura 46.** Esquema il·lustratiu de la immunització de porcs Landrace x Large White i la presa de mostres. Creat amb BioRender.com

#### 5.2.4.1 Caracterització de la resposta d'IgGs totals

El títol d'anticossos IgG totals anti-HAV en les diferents mostres obtingudes va ser quantificat mitjançant un assaig d'ELISA sandvitx indirecte seguint el protocol detallat en l'apartat 7.12.1, igual que es va fer amb els assajos amb ratolins BALB/c. En aquest assaig es feia ús d'un sèrum convalescent humà per la captura i els antígens testats eren càpsides de L0 i HP nues obtingudes de sobrenedants de cèl·lules FRhK-4 infectades, les quals eren posteriorment lisades amb el detergent NP40. Amb els resultats obtinguts es va comparar el potencial immune entre les partícules nues i les quasi-embolcallades, així com també entre els dos tipus d'adjuvant, Al(OH)<sub>3</sub> i CAF01.

La comparació de les cinètiques de producció d'IgG totals al llarg del temps mitjançant el reconeixement de HP<sub>n</sub> revela, tal i com s'esperava, que la producció d'IgG totals és molt menor pel preparat vacunal HP<sub>n</sub>-Al(OH)<sub>3</sub> en comparació amb la resta (**Figura 47A i B**). No obstant, només hi ha diferències estadísticament significatives amb la vacuna actual HAVRIX. La soca HP és ben reconeguda pels anticossos generats contra la vacuna actual HAVRIX. Aquest bon reconeixement no és inesperat, ja que tal i com s'indica a la introducció, la soca HP presenta unes característiques antigèniques similars a la soca L0, sent reconeguda pels anticossos policlonals.

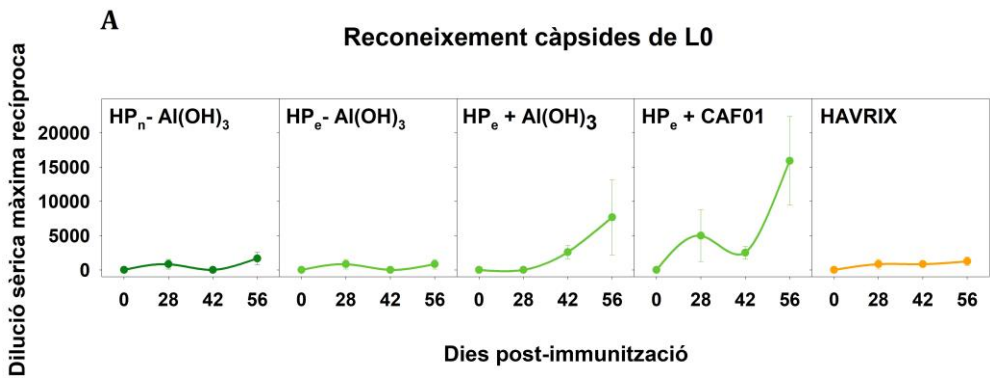


**B**

Producte vacunal	Mitjana dilució sèrica màxima recíproca	Positiu /total
HP <sub>n</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	166.67	2/6
HP <sub>e</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	5833.33	3/6
HP <sub>e</sub> + Al(OH) <sub>3</sub>	1666.67	2/6
HP <sub>e</sub> + CAF01	5166.67	4/6
HAVRIX	12500.00	3/6

**Figura 47. Producció d'anticossos IgG totals contra les càpsides de HP de sèrums de porcs inoculats amb HP<sub>n</sub>-Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub>-Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub>+Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub>+CAF01 i HAVRIX. A) Evolució al llarg del temps de la producció d'IgG totals. B) Taula resum de la mitjana de la dilució sèrica màxima recíproca i els sèrums positius respecte als totals al dia 56 p.i. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de HP. Les dades es mostren com la mitjana del grup ± l'error estàndard. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student, p<0.05) entre grups experimentals quan les lletres són diferents.**

Per altra banda, comparant les cinètiques de producció d'IgG totals reconeixent L0 (**Figura 48A**), s'observen resultats considerablement diferents respecte al reconeixement d'HP. Sorprenentment, el preparat vacunal HP<sub>e</sub> + CAF01 va generar alts nivells d'anticossos capaços de reconèixer la soca L0. Tanmateix, la soca L0 no és gaire ben reconeguda pels anticossos generats contra la vacuna actual HAVRIX. Aquest fet és sorprenent ja que la soca L0 és molt similar a la soca salvatge i esperariem que els anticossos generats contra la vacuna HAVRIX reconeguessin la soca. No obstant, sembla que reconeixen molt millor la soca HP. La soca que nosaltres anomenem L0 és la soca HM175/43c i la soca utilitzada per la vacuna HAVRIX és la HM175/18f.



**B**

Producte vacunal	Mitjana dilució sèrica màxima recíproca	Positius /total
HP <sub>n</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	1666.67	2/6
HP <sub>e</sub> - Al(OH) <sub>3</sub>	833.33	1/6
HP <sub>e</sub> + Al(OH) <sub>3</sub>	7666.67	4/6
HP <sub>e</sub> + CAF01	15916.67	6/6
HAVRIX	1250	6/6

**Figura 48. Producció d'anticossos IgG totals contra les càpsides de L0 de sèrums de porcs inoculats amb HP<sub>n</sub>-Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> + CAF01 i HAVRIX. A) Evolució al llarg del temps de la producció IgG totals. B) Taula resum de la mitjana de la dilució sèrica màxima recíproca i els sèrums positius respecte als totals al dia 56 p.i. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides de L0.**

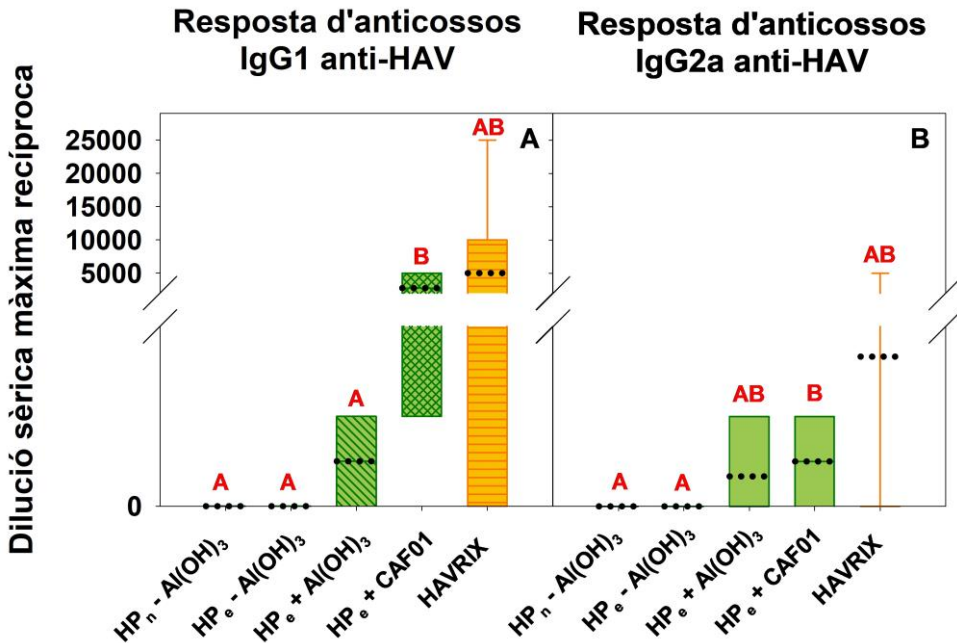
Aquestes dues soques són molt similars entre elles, però difereixen en una mutació (D3070A; substitució d'un àcid aspàrtic a la posició 70 de VP3 per una alanina) present en el lloc immunodominant [295]. Aquesta mutació podria explicar el baix reconeixement de la soca L0. Encara que aquesta mutació també es troba a la soca HP, el diferent plegament de la càpsida de la soca HP associat als canvis de codons podria compensar la pèrdua antigènica i fer que HP fos més semblant a la soca 18f utilitzada per generar la vacuna HAVRIX. A més, és important mencionar que tot i el baix reconeixement de les càpsides de L0, els 6 sèrums testats tenien presència d'anticossos capaços de reconèixer-la (**Figura 48B**) front a només 3 sèrums capaços de reconèixer les càpsides de HP, encara que aquests amb un reconeixement molt més elevat (**Figura 47B**).

#### 5.2.4.2 Caracterització de la resposta d'IgGs: resposta d'IgG1 i IgG2a

El títol d'anticossos IgG1 i IgG2a anti-HAV en les diferents mostres obtingudes va ser quantificat mitjançant un assaig d'ELISA sandvitx indirecte seguint els passos descrits en l'apartat 7.12.2, igual que es va fer amb els assajos amb ratolins BALB/c. En aquest assaig es feia ús d'un sèrum convalescent humà per la captura i els antígens testats eren càpsides d'HP nues produïdes en presència d'AMD. Amb els resultats obtinguts es va poder comparar la diferència de producció d'anticossos IgG1 anti-HAV i IgG2a anti-HAV entre els diferents grups experimentals.

Els resultats obtinguts utilitzant HP com a antigen de captura mostren com les immunitzacions de HP<sub>e</sub> + CAF01 i HAVRIX són les que generen més resposta d'anticossos tant d'IgG1 (**Figura 49A**) com d'IgG2a (**Figura 49B**) en porcs, sent superior en la primera. Aquests resultats són els esperats en el cas de la vacuna

HAVRIX, però en el cas de la immunització amb HP<sub>e</sub> + CAF01 esperàvem que induís més fortament la resposta Th1, la qual activa la producció d'IgG2a.



**Figura 49.** Títols de les respostes específiques IgG1 i IgG2a que reconeixen les càpsides d'HP dels sèrums provinents de porcs inoculats amb HP<sub>n</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> + CAF01 i HAVRIX al dia 56 post-inoculació. A) Resposta d'anticossos contra IgG1 anti-HAV dels diferents grups experimentals al dia de sacrifici. B) Resposta d'anticossos contra IgG2a anti-HAV de diferents grups experimentals al dia de sacrifici. La producció d'anticossos s'expressa com la màxima dilució sèrica recíproca que reconeix les càpsides d'HP. Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament, i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student, p<0.05) entre grups experimentals per una mateixa resposta d'anticossos quan les lletres són diferents.

Per altra banda, és important destacar que el grup experimental inoculat amb HP<sub>n</sub> sense Al(OH)<sub>3</sub> demostra que sense l'adjuvant no es genera una bona resposta immune en porcs. A més, no hi ha diferències estadísticament significatives entre la resposta d'anticossos IgG1 i IgG2a en els grups inoculats

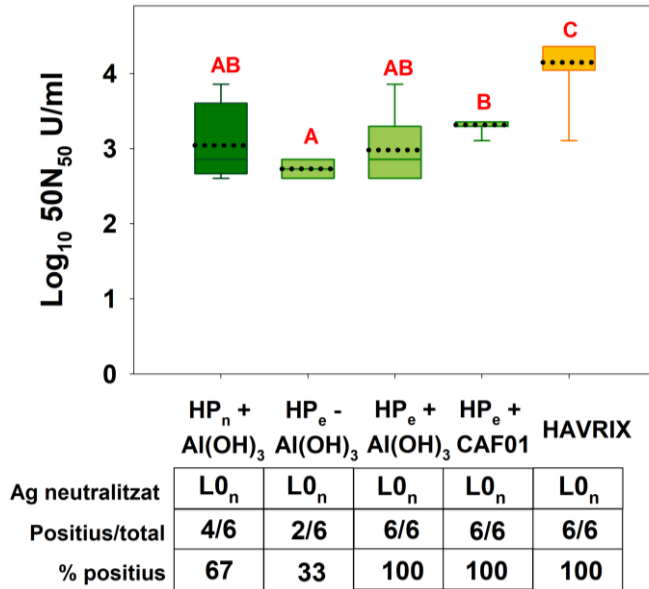
amb  $HP_e + Al(OH)_3$ , segurament al fet d'estar immunitzant amb partícules quasi-embolcallades i l'adjuvant a la vegada.

#### 5.2.4.3 Neutralització de la infectivitat *in vitro*.

La neutralització dels sèrums corresponents al grups experimentals a estudiar eren enfrontades a la neutralització exercida per un sèrum no immune obtingut dels porcs corresponents al grup 6. El protocol detallat es troba en l'apartat 7.12.3.

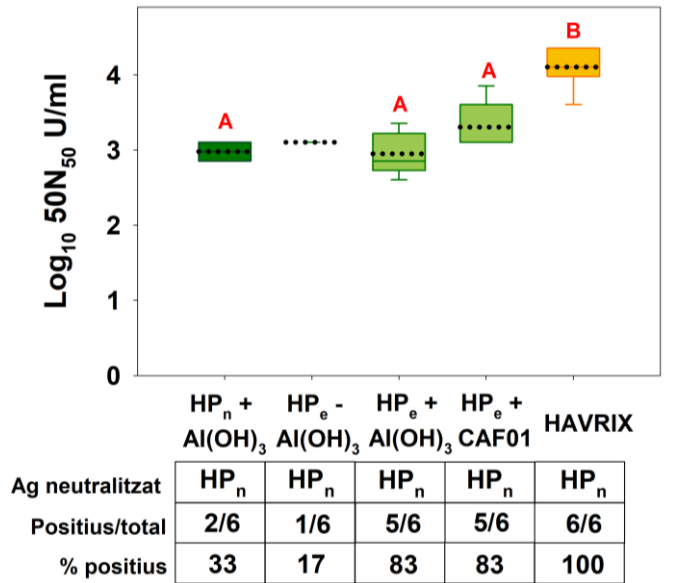
Igual que en el cas dels sèrums provinents dels ratolins BALB/C, les neutralitzacions es van realitzar només amb mostres de sèrum del dia 56 després de la immunització. Tots els sèrums es van testar a les dilucions 1/50 i 1/100. La capacitat de neutralització es va expressar com el  $\text{Log}_{10}$  del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 50% de  $1 \times 10^5$  unitats  $\text{TCID}_{50}$  en un 50% de les rèpliques ( $\text{Log}_{10} 50N_{50}$  U/ml). És a dir, el  $\text{Log}_{10}$  del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar 50,000 unitats  $\text{TCID}_{50}$  en un 50% de les rèpliques analitzades.

La vacuna HAVRIX, el control positiu de l'experiment, té una alta capacitat de neutralització (**Figura 50**). Això era esperable, doncs està ben documentat que un 99% dels individus que reben la vacuna presenten anticossos anti-HAV 30 dies després de ser vacunats amb la primera dosi [28], [296], [297]. En el cas dels prototips  $HP_e + Al(OH)_3$  i  $HP_e + CAF01$  el 100% dels sèrums testats són capaços de neutralitzar la soca L0 d'HAV, encara que amb una capacitat menor que els sèrums immunitzats amb HAVRIX. Per tant, tot i no arribar als nivells de protecció de la vacuna HAVRIX, aconseguim que tots els porcs produeixin IgGs neutralitzants.



**Figura 50. Neutralització d'infectivitat de la població L0 per sèrums de porcs inoculats amb els antigens HP<sub>n</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> + CAF01 i HAVRIX.** La neutralització d'infectivitat s'expressa com Log<sub>10</sub> del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 50% de 1x10<sup>5</sup> unitats TCID<sub>50</sub> en un 50% de les rèpliques (Log<sub>10</sub> 50N<sub>50</sub> U/ml). Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament. Les línies contínues representen el percentil del 50% i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament. L'antigen neutralitzat, la proporció de positius respecte el total i el percentatge de positius s'indiquen a sota del gràfic. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student, p<0.05) entre dos candidats vacunals quan les lletres són diferents.

L'alta capacitat de neutralització de la vacuna HAVRIX també s'observa quan els sèrums són testats contra la soca HP (**Figura 51**). Aquestes dades també mostren una bona neutralització per part dels sèrums provinents de porcs immunitzats amb els candidats vacunals HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub> i HP<sub>e</sub> + CAF01.



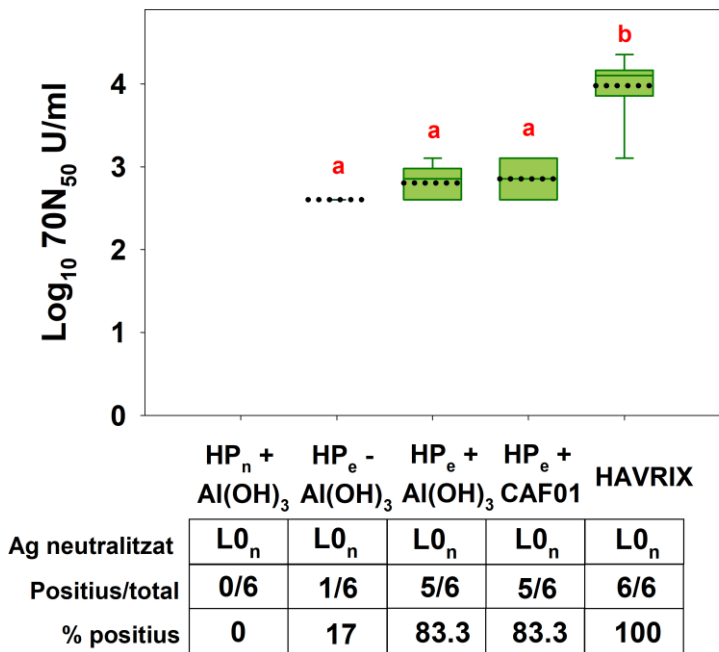
**Figura 51. Neutralització d'infectivitat de la població HP per sèrums de porcs inoculats amb els antigens HP<sub>n</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, HP<sub>e</sub> + CAF01 i HAVRIX.** La neutralització d'infectivitat s'expressa com Log<sub>10</sub> del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 50% de 1x10<sup>5</sup> unitats TCID<sub>50</sub> en un 50% de les rèpliques (Log<sub>10</sub> 50N<sub>50</sub> U/ml). Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament. Les línies contínues representen el percentil del 50% i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament. L'antigen neutralitzat, la proporció de positius respecte el total i el percentatge de positius s'indiquen a sota del gràfic. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student, p<0.05) entre dos candidats vacunals quan les lletres són diferents.

Per acabar d'analitzar bé aquests resultats, es va calcular la capacitat de neutralització expressant-la com a Log<sub>10</sub> 70N<sub>50</sub> U/ml (Log<sub>10</sub> unitats capaces de neutralitzar el 70% de 1 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> en el 50% de les rèpliques per ml) i 90N<sub>50</sub> U/ml (Log<sub>10</sub> unitats capaces de neutralitzar el 90% de 1 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> en el 50% de les rèpliques per ml). Aquest anàlisi només s'ha realitzat amb les dades de neutralització d'infectivitat de la població L0, la qual donava nivells de neutralització més elevats.

S'observa que menys el grup experimental immunitzat amb HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, tots tenen algun porc capaç de neutralitzar 70,000 unitats TCID<sub>50</sub> en el 50% de

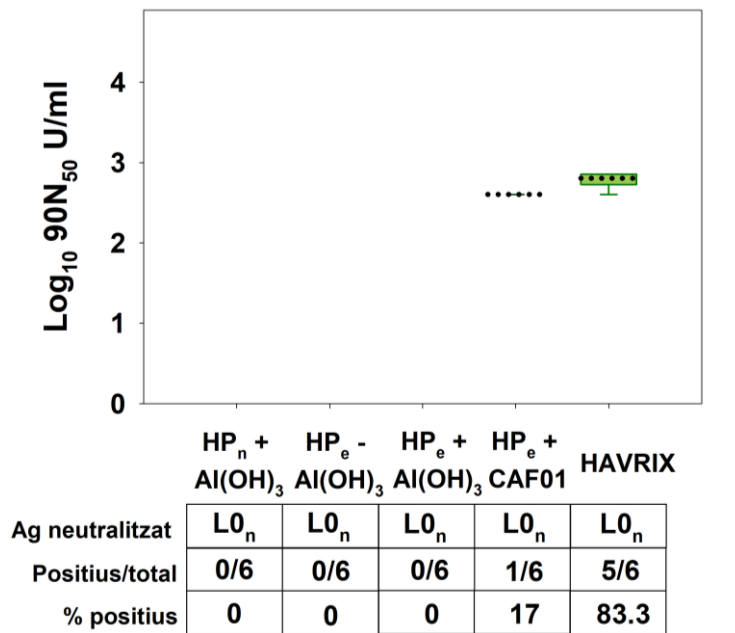


les rèpliques testades (**Figura 52**). Cal destacar que els porcs immunitzats amb  $HP_e + Al(OH)_3$  o  $HP_e + CAF01$  tenen una molt bona capacitat de neutralització, ja que pràcticament tots són capaços de neutralitzar el 70% dels virus a neutralitzar. Tanmateix, els 100% dels porcs immunitzats amb la vacuna HAVRIX assoleixen aquest alt nivell de neutralització.



**Figura 52. Neutralització d'infectivitat de la població  $L0$  per sèrums de porcs inoculats amb els antigens  $HP_n - Al(OH)_3$ ,  $HP_e - Al(OH)_3$ ,  $HP_e + Al(OH)_3$ ,  $HP_e + CAF01$  i HAVRIX.** La neutralització d'infectivitat s'expressa com  $Log_{10}$  del nombre d'unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 70% de  $1 \times 10^5$  unitats  $TCID_{50}$  en un 50% de les rèpliques ( $Log_{10} 70N_{50}$  U/ml). Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament. Les línies contínues representen el percentil del 50% i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament. L'antigen neutralitzat, la proporció de positius respecte el total i el percentatge de positius s'indiquen a sota del gràfic. Hi ha diferències estadísticament significatives (t de Student,  $p < 0.05$ ) entre grups quan les lletres són diferents.

Si s’analitza la neutralització expressant-la com a  $90N_{50}$  U/ml, es perd la majoria de la positivitat (**Figura 53**). Només en el cas dels porcs immunitzats amb  $HP_e + CAF01$  hi ha un porc capaç de neutralitzar 90,000 unitats  $TCID_{50}$  en el 50% de les rèpliques testades. En canvi, en el grup experimental amb HAVRIX segueixen sent positius el 83.3% dels porcs immunitzats posant en evidència l’exigència del nostre test de neutralització. Tanmateix, cal recordar que degut a la lenta replicació del virus, la vacuna actual és cara de produir i utilitzant la soca HP, la qual replica molt més ràpid, es podrien abaratir els costos de producció.



**Figura 53. Neutralització d’infectivitat de la població  $L0$  per sèrums de porcs inoculats amb els antigens  $HP_n - Al(OH)_3$ ,  $HP_e - Al(OH)_3$ ,  $HP_e + Al(OH)_3$ ,  $HP_e + CAF01$  i HAVRIX.** La neutralització d’infectivitat s’expressa com  $Log_{10}$  del nombre d’unitats per ml de sèrum capaces de neutralitzar el 90% de  $1 \times 10^5$  unitats  $TCID_{50}$  en un 50% de les rèpliques ( $Log_{10} 70N_{50}$  U/ml). Les dades es mostren com a boxplot. Les línies negres discontinües indiquen la mitjana dels valors. El bigoti i la caixa inferior representen els percentils del 5% i el 25%, respectivament. Les línies contínues representen el percentil del 50% i la caixa i el bigoti superior representen el percentil 75 i el 90%, respectivament. L’antigen neutralitzat, la proporció de positius respecte el total i el percentatge de positius s’indiquen a sota del gràfic.

### 5.2.5 Comparativa de la capacitat de neutralització de la infectivitat *in vitro* entre sèrums provinents de ratolins BALB/C i porcs Landrace x Large White

Amb el conjunt de tots els resultats obtinguts en la neutralització de la infectivitat *in vitro* de l'HAV, s'ha fet una comparativa entre els sèrums provinents dels ratolins BALB/C i els porcs Landrace x Large White per tal de observar diferències en la seva capacitat immunogènica.

Per poder comparar bé les respostes entre tots els preparats vacunals, es van agafar totes les dades expressades com a  $\text{Log}_{10} 50\text{N}_{50}$  U/ml, en la qual tenim positius en tots els preparats vacunals. La mesura  $\text{Log}_{10} 50\text{N}_{50}$  U/ml es va normalitzar a  $50\text{N}_{50}$  U/animal tenint en compte els ml de sang en cada animal: 1.5 ml i 5.6 L de sang en ratolins i porcs, respectivament.

Tal i com s'ha comentat anteriorment a l'apartat **5.2.2.3**, entre els diferents productes vacunals inoculats a ratolins BALB/C, no veiem diferències destacables (**Taula 5**). En canvi, sí que observem que els porcs immunitzats amb el producte vacunal  $\text{HP}_e + \text{CAF01}$  presenten un gran número d'unitats/animal capaces de neutralitzar 50,000 unitats  $\text{TCID}_{50}$  en el 50% de les mostres. Els seus resultats són molt prometedors i a diferència de la resta de productes vacunals, s'acosten molt als de la vacuna actual HAVRIX.

Per altra banda, tot i haver-hi alguns productes vacunals que no han sigut testats en porcs Landrace x Large White, però sí en ratolins BALB/C, i a la inversa, comparant els que s'han inoculat en ambdós animals, s'observa amb claredat com la capacitat de producció d'anticossos neutralitzants és molt més elevada en porcs que en ratolins. Concretament, la seva producció per animal és d'uns 4-5  $\text{Log}_{10}$  més alta respecte a la dels ratolins BALB/C.

**Taula 5. Anàlisi comparatiu de neutralització de la infectivitat *in vitro* dels sèrums provinents de ratolins BALB/C i porcs Landrace x Large White.**

BALB/C			Landrace x Large White		
Producte vacunal	Log <sub>10</sub> 50N <sub>50</sub> U/ml <sup>1</sup>	50N <sub>50</sub> U/animal <sup>2</sup>	Producte vacunal	Log <sub>10</sub> 50N <sub>50</sub> U/ml <sup>1</sup>	50N <sub>50</sub> U/animal <sup>2</sup>
<b>LO<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub></b>	2.21 ± 0.09	243.27 ± 56.02	<b>LO<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub></b>	No data	No data
<b>LO<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub></b>	2.24 ± 0.17	259.67 ± 125.89	<b>LO<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub></b>	No data	No data
<b>HP<sub>n</sub> - Al(OH)<sub>3</sub></b>	2.28 ± 0.05	285.82 ± 34.87	<b>HP<sub>n</sub> - Al(OH)<sub>3</sub></b>	3.04 ± 0.24	6.14E+06 ± 4.53 E+06
<b>HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub></b>	2.33 ± 0.09	323.34 ± 60.65	<b>HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub></b>	No data	No data
<b>HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub></b>	2.16 ± 0.10	214.33 ± 58.62	<b>HP<sub>e</sub> - Al(OH)<sub>3</sub></b>	2.73 ± 0.09	3E+06 ± 6.99E+05
<b>HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub></b>	2.21 ± 0.11	240.49 ± 72.90	<b>HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub></b>	2.98 ± 0.18	5.35E+06 ± 2.74E+06
<b>HP<sub>e</sub> + CAF01</b>	No data	No data	<b>HP<sub>e</sub> + CAF01</b>	3.31 ± 0.04	1.14E+07 ± 1.14E+06
<b>HAVRIX</b>	No data	No data	<b>HAVRIX</b>	4.14 ± 0.19	7.73E+07 ± 4.42E+07

<sup>1</sup> Mitjana i error estàndard del Log<sub>10</sub> 50N<sub>50</sub> U/ml de la neutralització de la infectivitat *in vitro*.

<sup>2</sup> Mitjana de 50N<sub>50</sub> U/animals tenint en compte que els ratolí BALB/C i els porc Landrace x Large White contenen aproximadament 1.5 ml i 5.6 L de sang, respectivament.

Aquesta gran diferència en la producció d'anticossos neutralitzants entre els dos models d'animal pot ser deguda als dos sistemes immunològics considerablement diferents entre ratolins i porcs [298], [299].

## 5.3 Discussió

Atès que només existeix un serotip d'HAV, està clar que la millor mesura efectiva per prevenir brots d'HAV és mitjançant la vacunació. Actualment, existeixen diverses vacunes atenuades i inactivades contra l'HAV llicenciades arreu del món, però són molt costoses i en ocasions escasses [15], [185], [300]. Per aquest motiu, el gran desafiament actual en la indústria farmacèutica és crear noves vacunes més assequibles contra l'HAV. Als anys 60, es van descobrir els liposomes i des de llavors, són els nanotransportadors més comunament utilitzats al tenir una membrana molt similar a la membrana lipídica cel·lular i per tant, no ser rebutjats per l'hoste al ser introduïts [291]. Moltes vacunes basades en liposomes han sigut aprovades gràcies al seu eficient sistema d'entrega, el qual permet alliberar el seu *cargo* poc a poc al llarg del temps. Recentment, s'ha suggerit una altra alternativa a les vacunes clàssiques inactivades que són les vacunes que contenen partícules similars a virus (VLPs), les quals utilitzen una estratègia similar, però mimetitzant la conformació de proteïnes virals [293]. D'entre elles, cal destacar vacunes que ja s'estan comercialitzant per Hepatitis E [301], hepatitis B [302] i papilomavirus [303]. La vacuna inactivada llicenciada EPAXAL contra l'HAV és una vacuna liposomal que es troba absorbida a la superfície de virosomes d'*Influenza* reconstituïts, els quals reemplacen l'hidròxid d'alumini com a adjuvant principal [179]. La nostra proposta es basa en aprofitar la combinació de l'alta replicació de la soca HP i la seva eficient sortida en forma quasi-embolcallada. Els embolcalls lipídics estan sent molt prometedors en el camp de les vacunes i s'ha pogut observar que són molt immunogènics [304].

Tradicionalment, la immunogenecitat de les vacunes inactives s'incrementa amb l'addició d'adjuvants, com és l'hidròxid d'alumini. Tanmateix, un altre dels principals inconvenients present en la producció de vacunes és la manca d'adjuvants segurs i eficaços, sobretot que generin resposta Th1, la qual serveix per l'eliminació d'infeccions víriques. Les nostres dades sobre la producció d'anticossos IgG totals en ratolins BALB/C indiquen que independentment de l'immunogen inoculat, els ratolins produeixen una quantitat similar d'anti-HAV IgG totals. Aquests resultats corroboren la nostra hipòtesis de què els quasi-embolcalls són una bona estratègia per potenciar la resposta immune, sense la necessitat de fer ús d'adjuvants. A més, també emfatitzen la bona candidata que és la immunització amb partícules HP<sub>e</sub>, la nostra proposta com a nova base vacunal. La seva lleugera disminució en la producció d'anticossos respecte a les partícules L0<sub>n</sub>, no seria un inconvenient ja que es veuria compensada per la seva eficient replicació, la qual és 5 vegades superior respecte a la població L0.

El títol d'anticossos IgG1 i IgG2a anti-HAV en les diferents mostres ens recalca la diferència de producció entre partícules nues i partícules quasi-embolcallades. Comparant els grups experimentals L0<sub>n</sub> vs L0<sub>e</sub> i HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub> vs HP<sub>e</sub> + Al(OH)<sub>3</sub>, s'obté clarament una major producció de IgG1 respecte a IgG2a en ratolins inoculats amb partícules nues i una major producció de IgG2a respecte a IgG1 en ratolins inoculats amb partícules quasi-embolcallades. Aquestes dades concorden perfectament amb el fet de què l'hidròxid d'alumini activaria més eficientment la resposta Th2, mentre que els quasi-embolcalls conduirien més cap a una resposta Th1. Tanmateix, aquesta tendència no s'observa comparant HP<sub>n</sub> + Al(OH)<sub>3</sub> vs HP<sub>e</sub>. Tot plegat, aquestes dades ens proporcionen informació rellevant per dissenyar una base vacunal que sigui capaç d'estimular més la resposta Th1, la qual serveix per a l'eliminació del virus.

L'estudi de neutralització, el qual permet avaluar la capacitat de neutralitzar la infectivitat de l'HAV per part dels anticossos produïts en els ratolins, demostra que la capacitat de neutralització dels sèrums provinents de ratolins immunitzats tant amb partícules nues com quasi-embolcallades és pràcticament idèntica, no hi ha diferències entre elles. Aquestes dades emfatitzen la bona immunogenicitat dels quasi-embolcalls que envolten les partícules d'HAV. Si es compara la base de la vacuna actual (L0<sub>n</sub>) amb la nostra proposta (HP<sub>e</sub>), tampoc es detecten diferències estadísticament significatives, tornant a subratllar la bona immunogenicitat que té la soca HP i evidenciant de nou la bona estratègia vacunal que seria utilitzar les partícules quasi-embolcallades, sent una estratègia molt més natural i igual o més immunogènica que la vacuna actual.

Per altra banda, en la immunització de porcs Landrace x Large White s'ha observat una bona inducció d'IgG totals i donat que tenen un sistema immune molt similar al dels humans [298], aporten informació molt rellevant de cara a noves estratègies vacunals. Les dades de producció d'IgG totals obtingudes ens corroboren que els productes quasi-embolcallats són molt immunogènics. A més, ens aporten resultats molt prometedors sobre l'adjuvant CAF01, el qual juntament amb les partícules quasi-embolcallades provoca una producció d'IgG totals molt elevada, similar a la vacuna HAVRIX. Aquest adjuvant seria molt bo de cara a una vacuna contra un virus, com és el cas de l'HAV, ja que en els resultats on es determina la producció d'anticossos IgG2a anti-HAV, s'ha vist una resposta accentuada de Th1.

La neutralització de la infectivitat *in vitro* de l'HAV també confirma que el producte vacunal HP quasi-embolcallat amb l'adjuvant CAF01 és el que és capaç d'induir la producció més alta d'anticossos neutralitzants en porcs. També, el producte vacunal HP quasi-embolcallat amb l'adjuvant Al(OH)<sub>3</sub> dona resultats

molt prometedors. Cap dels dos ha aconseguit arribar a la protecció de la vacuna HAVRIX, però tenint en compte que la soca HP replica molt més ràpid, es podria veure compensat amb una obtenció de la vacuna a temps més curts que abaratirien els costos de producció. Per aquest motiu, la nostra proposta vacunal utilitzant la soca de replicació ràpida HP i les partícules quasi-embolcallades segueix sent bona per implementar noves estratègies vacunals per l'HAV i altres patògens.

És important fer èmfasi a què en el nostre estudi les neutralitzacions es feien amb 100,000 virus infecciosos totals, els quals són molts comparativament amb les neutralitzacions realitzades en altres estudis. Hi ha una falta d'estandardització per fer els càlculs de neutralització i per aquests motius, en aquest estudi s'ha calculat amb les unitats  $50N_{50}/ml$ .

Intentar explicar com els anticossos aconsegueixen neutralitzar el virus, és motiu de controvèrsia des del descobriment que la gran majoria, si no totes, les partícules d'HAV circulants en la sang estan en la forma quasi-embolcallades. Aquests virions estan completament envoltats per la membrana de l'hoste, la qual es creu que protegeix la càpsida de la neutralització produïda pels anticossos neutralitzants a la sang durant les infeccions agudes. Fins al moment, no s'ha detectat proteïnes virals que es mostrin a la superfície de les partícules eHAV, suggerint que el virus ha desenvolupat una estratègia intel·ligent per evadir la neutralització [13], [256]. Tanmateix, ha sigut demostrat que la infecció per eHAV provoca una resposta d'anticossos contra el virus [305]. Les nostres dades de neutralització també confirmen que tant els ratolins com els porcs han sigut capaços de generar anticossos neutralitzants contra l'eHAV. Una possible explicació de com els anticossos neutralitzants són capaços d'interaccionar amb els epítops d'eHAV és que la membrana d'eHAV es degradi al lisosoma, permetent l'accés d'anticossos neutralitzants a la càpsida [13],



[256]. Una segona explicació és que la membrana d'eHAV es fusioni amb l'endosoma tardà alliberant el contingut de l'exosoma dins del citoplasma per ser transcrit i és en aquest moment on els anticossos neutralitzants podrien entrar en contacte amb la càpsida [63]. Sigui com sigui l'alliberament de la càrrega dels quasi-embolcalls, està clar que en algun moment del cicle infecció de l'HAV, les càpsides queden al descobert i poden ser reconegudes pels anticossos neutralitzants.

En el nostre estudi d'immunització en animals hi ha certes limitacions que poden fer variar els resultats obtinguts. Primer de tot, les immunitzacions han sigut realitzades amb immunògens no purificats, la qual cosa podria fer variar els resultats respecte a immunitzacions amb immunògens purificats evitant interaccions inespecífiques. En segon lloc, una possible explicació de les diferències en la resposta immune dins de cada grup experimental, pot venir donada per la variabilitat entre diferents individus, la qual és inevitable. Per aquestes limitacions, s'estan duent a terme més estudis experimentals on s'utilitza un model de ratolins (Ifn<sup>-/-</sup>) altament susceptible a infeccions virals. Aquests ratolins són vacunats amb els diferents productes vacunals i posteriorment, són desafiats amb la població L0 de l'HAV per tal de confirmar l'eficàcia protectora de la vacuna candidata i obtenir més informació sobre la resposta immune front a l'HAV en ratolins. La protecció davant la infecció per el virus també serà validada en un segon model de ratolins, B6;129 MAVStm1Zjc/J, el qual és altament patogènic per HAV.

## **6. CONCLUSIONS**



- L'expressió de RAB7A i RAB35 augmenta amb la replicació de l'HAV en cèl·lules Huh7-AI, sobretot per la població HP.
- El silenciament de RAB35 en cèl·lules Huh7-AI inhibeix la sortida de la població HP.
- Les càpsides de L0 i HP colocalitzen amb RAB7A i RAB35, respectivament.
- La població HP surt indistintament a través de les membranes basolateral i apical. En canvi, la població L0 s'allibera majoritàriament pel domini apical.
- La població HP utilitza la xarxa de tràfic controlada per RAB35, i en menor mesura RAB11A. En canvi, la població L0 utilitzaria la xarxa de trànsit controlada per RAB7A, i en menor mesura RAB11A.
- La membrana basolateral dels hepatòcits està enriquida en RAB35. En conseqüència, la major sortida de la població HP per la membrana basolateral respecte la població L0 es podria explicar per una major eficiència d'interacció amb la xarxa controlada per RAB35.
- La càpsida de la població HP difereix de la càpsida de la població L0 en dos aminoàcids; un d'ells és el canvi d'una S per una G en la posició 134 de la VP2, que es localitza a 4.5A de la Y d'un dels *late domains* del virus. Aquesta substitució li permetria a la població HP interaccionar mitjançant un mecanisme diferent amb ALIX que afavoriria el trànsit cap a la membrana basolateral i la seva sortida en forma quasi-embolcallada.
- Tots els hepatovirus, excepte els que infecten primats, tenen una S en la posició 134 de VP2, mentre que la resta d'hepatovirus tenen una G. Aquest canvi podria haver estat seleccionat per reduir la sortida a través de la membrana basolateral, contribuint a evadir la resposta immune, més forta en simis superiors.
- La població HP mostra uns nivells de replicació més elevats i és més ràpida que la parental L0 en cèl·lules MRC-5, VERO i, especialment, en FRhK-4, fet pel qual aquestes últimes serien un substrat candidat òptim per suplir la falta de cultius cel·lulars per a la producció de vacunes.

## Conclusions

---

- Els quasi-embolcalls són una bona estratègia vacunal per potenciar la resposta immune, evitant l'ús d'adjuvants.
- L'adjuvant CAF01, juntament amb les partícules quasi-embolcallades, provoca una bona resposta immune, similar a la vacuna HAVRIX, i a més, amb una resposta accentuada de Th1.

## **7. MATERIALS I MÈTODES**



## 7.1 Cèl·lules i virus

### 7.1.1 Línies cel·lulars

Les línies cel·lulars utilitzades en aquest treball són:

**MRC-5:** cèl·lules diploides derivades de fibroblasts fetals humans comunament utilitzades en la producció de vacunes víriques, ([306]. Es fan créixer a 37°C en medi essencial mínim (MEM) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (FBS). Es subcultiven cada 7 dies a una relació de multiplicació entre 1:2 i 1:5, arribant a la monocapa confluent als 2-3 dies després de la incubació a 37°C.

**Vero:** cèl·lules contínues aïllades de cèl·lules epitelials de ronyó de mono verd (*Cercopithecus aethiops*) [307]. Es fan créixer a 37°C en MEM suplementat amb un 5% de FBS. Es subcultiven cada 7 dies a una relació de multiplicació 1:5, arribant a la monocapa confluent als 2-3 dies després de la incubació a 37°C. És important recalcar que la replicació de l'HAV en cèl·lules Vero requereix d'una incubació a 33°C.

**FRhK-4:** cèl·lules epiteloides i derivades de cèl·lules embrionàries de ronyó de mono rhesus (*Macaca mulatta*) [308]. Aquestes cèl·lules creixen a 37°C en MEM suplementat amb un 15% de FBS inactivat (FBSi). Es subcultiven cada 7 dies a una relació de multiplicació 1:3, arribant a la monocapa confluent als 2-3 dies després de la incubació a 37°C.

Aquesta línia cel·lular va ser utilitzada per l'estudi de replicació de l'HAV, i també durant tot el desenvolupament de la tesis per a l'obtenció de suspensions virals de la població parental HM175-L0 i la de replicació ràpida HM175-HP i



per la quantificació del número de partícules infeccioses de les suspensions virals (TCID<sub>50</sub>).

**Huh7-AI:** línia cel·lular d'hepatòcits humans derivada de la línia Huh7 (*Human hepatocarcinoma*) cedides per G.Kaplan [219], del Center for Biologics Evaluation and Research (Maryland, Estats Units). La sublínia Huh7-AI mostra una alta permissivitat a la infecció per l'HAV. Aquesta línia cel·lular també es cultiva a 37°C en MEM suplementat amb un 10% de FBS. També, es subcultiva cada 7 dies amb una relació de multiplicació 1:7, aconseguint-se una monocapa confluent al cap de 2-3 dies després de la incubació a 37°C. Aquestes cèl·lules van ser utilitzades per l'estudi del cicle biològic de l'HAV.

Solucions necessàries pel creixement de les línies cel·lulars:

***Medi Mínim Essencial (MEM):***

MEM 1X amb sals Eagle autoclavat durant 20 minuts i suplementat en condicions d'esterilitat amb:

NaHCO <sub>3</sub> .....	2 % (v/v)
HEPES .....	15 mM
L-Glutamina .....	2 mM
NEAA .....	1X
FBS .....	5%, 10 % i 15% (v/v) segons la línia
Penicilina – Estreptomicina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

Conservar a 4 °C.

**Tampó PBS:**

NaCl .....	8 g/l
KCl .....	0.2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.15 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.2 g/l

En H<sub>2</sub>O bidestil·lada.

Ajustar el pH a 7.1-7.2 si és necessari.

Esterilitzar per autoclau durant 20 min.

Conservar a 4 °C.

**Tripsina-EDTA:**

Tripsina .....	2.5 g/l
EDTA .....	0.2 g/l
Penicilina – Estreptomina ...	100 UI/ml – 100 µg/ml

En tampó PBS.

Esterilitzar per filtració.

Conservar a -20°C.

### 7.1.2 Recompte de la viabilitat cel·lular

En alguns experiments, es va necessitar comptabilitzar el número de cèl·lules que es sembraven en la preparació en format de plaques o *transwells*. El recompte es va fer segons el següent protocol:

*a) Preparació de la suspensió cel·lular i comptatge:*

- Tripsinitzar les cèl·lules.
- Afegir el volum adequat de MEM 10-15% SFB per inactivar la tripsina. El percentatge de FBS depèn de la línia cel·lular utilitzada.
- Agafar 90µl de la suspensió cel·lular i afegir-li 10µl de blau tripà.
- Barrejar bé i introduir 10µl de la suspensió cel·lular amb blau tripà a la cambra de Neubauer, coberta prèviament amb un cobreobjectes.
- Observar la preparació en la cambra de Neubauer. Tenint en compte que idealment el número de cèl·lules a comptar en cadascun dels quadrants de la cambra de Neubauer hauria de ser entre 10 i 100 cèl·lules. En cas que el número sigui superior a 100, s'ha de diluir més la suspensió cel·lular. La dilució emprada s'ha de tenir present a l'hora d'efectuar els càlculs de la concentració cel·lular.
- Comptar les cèl·lules viables en cadascun dels quatre quadrants de la cambra. El blau tripà penetra únicament en les cèl·lules no viables, per tant, les cèl·lules no viables es veuen blaves i les viables refringents. En el cas que quedin cèl·lules just a la vora dels quadrants, comptar les que quedin en dos d'ells (ex: vora superior i dreta), sempre seguint el mateix criteri en cadascun dels quatre quadrants.

b) Càlcul de la concentració:

Un cop s'ha fet el recompte dels 4 quadrants res de la cambra Neubauer, es fa la mitjana i s'aplica la següent fórmula:

$$\text{Concentració en la suspensió (cèl/ml)} = [(\text{cèl·lules contades}/4) \times 10,000] \times \text{FD}_a$$

En el cas que s'hagi hagut de fer una dilució, s'ha de transformar la concentració obtinguda durant el recompte cel·lular en la concentració de la mostra multiplicant pel factor de dilució (FD<sub>a</sub>).

Per saber el volum a sembrar en cada estudi es va tenir en compte la concentració de cèl·lules viables en la suspensió (cèl·lules/ml), el format de la placa o *transwell* (ml/pou) i la concentració òptima de suspensió a sembrar (cèl·lules/ml).

### 7.1.3 Poblacions víriques

Al llarg d'aquest treball s'han utilitzat dues poblacions víriques derivades de la soca HM175/43c de l'HAV (número d'accés GenBank: M59809) [217]. Aquestes poblacions havien estat prèviament obtingudes al grup de Virus Entèrics a partir de passatges seriat, a intervals de 7 dies, en cèl·lules FRhK-4 on la soca 43c és citopatogènica [231], [265]. D'una banda es va obtenir la població parental o HM175-L0, que prové de la soca HM175/43c després de replicar 5 passatges en absència d'actinomicina D (AMD, *Sigma*). D'altra banda es va obtenir la població de replicació ràpida HM175-HP, la qual és el resultat d'un procés de *molecular breeding* entre dues poblacions adaptades a diferents condicions de silenciament cel·lular, F0.05LA (120 passatges en 0.05 µg/ml

d'AMD) i F0.2LA (65 passatges en 0.05 µg/ml d'AMD + 70 passatges en 0.2 µg/ml d'AMD) [231].

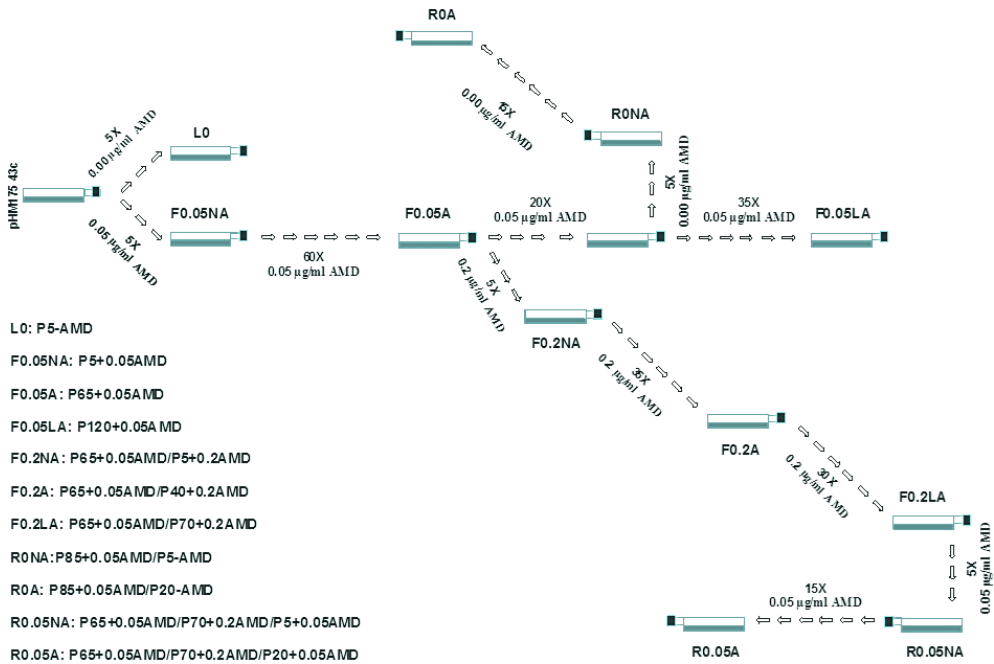


Figura 52. Esquema del flux de treball dels processos d'adaptació realitzats en el grup de Virus Entèrics per a l'obtenció de poblacions de l'HAV adaptades a diferents nivells de silenciament cel·lular. Imatge adaptada de [61].

### 7.1.4 Obtenció de suspensions víriques de la soca parental HM175-L0 i la soca HM175-HP en cèl·lules FRhK-4

Les suspensions víriques emprades en els diferents assajos es van produir infectant amb la soca parental HM175-L0 o HM175-HP flascons de monocapes confluents de cèl·lules FRhK-4 preparades 3-4 dies previs a la infecció. Es va seguir el següent protocol:

- Decantar el medi de creixement dels flascons de cultiu i infectar la monocapa cel·lular amb una multiplicitat d'infecció (MOI) d'un virus infeccios per cada cèl·lula (MOI=1) en un volum final de 3 ml.
- Incubar els flascons a 37°C durant 60 minuts per permetre l'adsorció del virus a les cèl·lules.
- Incorporar el medi post-infecció, amb la mateixa composició que el medi de creixement, però amb 2% de FBSi. En el cas de les infeccions amb la soca HM175-HP, suplementar el medi amb 0.05 µg/ml d'AMD .
- Incubar a 37°C durant 7-8 dies fins a tenir un efecte citopàtic (CPE) generalitzat.
- Per obtenir els virus alliberats al sobrenedant, recuperar aquest i centrifugar a 1,500 x g durant 10 minuts. Finalment, recuperar el sobrenedant i guardar-lo a -80°C.
- Per obtenir el total de virus produïts, lisar les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació-descongelació a -80°C. Centrifugar el cultiu lisat a 3,000 x g durant 20 minuts per tal d'obtenir una suspensió vírica lliure de restes cel·lulars. Finalment, guardar les suspensions víriques a -80°C.

### **7.1.5 Producció de suspensions concentrades amb títols alts de partícules víriques en cèl·lules FRhK-4**

Per a la producció d'antigen víric per la inoculació subcutània de ratolins BALB/C i porcs Landrace x Large White, es van concentrar les suspensions víriques de la soques HM175-L0 i HM175-HP prèviament obtingudes en cèl·lules FRhK-4, tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior **7.1.4**. Per a la concentració, es va seguir el següent protocol:

- Centrifugar dos cops a 10,000 x g durant 30 minuts a 4°C per eliminar restes cel·lulars.

- Ultra-centrifugar a 27,000 x rpm en el rotor 32Ti 2 hores a 4°C.
- Decantar el sobrenedant i re-suspensió el *pellet* en 1ml d'HEPES 15mM. Aquesta fracció representa els virus quasi-embolcallats.
- Per obtenir virus nus, lisar la fracció anterior amb un 3% de NP40 durant 30 minuts a 37°C, seguit de 3 cicles de sonicació a 60W durant 30 segons i posteriorment, realitzar 3 cicles de congelació i descongelació a -80°C i 37°C, respectivament.
- Guardar la suspensió vírica a 4°C si és per a ús immediat o a -80°C per a ús posterior.
- Per tal d'inactivar les partícules víriques concentrades, incubar-les durant 3 hores sota llum UV en condicions estèrils. Posteriorment, comprovar que la suspensió d'HAV s'ha inactivat correctament quantificant el títol infecció abans i després del tractament seguint el protocol detallat a l'apartat 7.1.7.

### **7.1.6 Replicació del virus parental HM175-L0 i del mutant HM175-HP en cèl·lules Huh7-AI**

Les suspensions víriques obtingudes en la línia cel·lular FRhK-4 segons el protocol detallat a 7.1.4, es van utilitzar per infectar flascons de monocapes confluents de cèl·lules Huh7-AI preparades 5-7 dies previs a la infecció. Es va seguir el següent protocol :

- Decantar el medi de creixement dels flascons de cultiu i infectar la monocapa cel·lular amb la MOI necessària i determinada per cada experiment (generalment una MOI=5).
- Incubar els flascons a 37°C durant 60 minuts per a permetre l'adsorció del virus a les cèl·lules.

- Incorporar el medi post-infecció, de composició idèntica al medi de creixement, però amb un 2% de FBS.
- Incubar a 37°C durant el temps que requereixi l'experiment que l'expressarem com dies post-infecció (d.p.i.).
- Per obtenir els virus alliberats al sobrenedant, recuperar aquest i centrifugar a 1,500 x g durant 10 minuts. Finalment, recuperar el sobrenedant i guardar-lo a -80°C.
- Per obtenir el total de virus produïts, lisar les cèl·lules mitjançant tres cicles de congelació-descongelació -80°C. Centrifugar el cultiu lisat a 3,000 x g durant 20 minuts per tal d'obtenir una suspensió vírica lliure de restes cel·lulars. Finalment, guardar les suspensions víriques a -80°C.

### **7.1.7 Quantificació del títol infecció de les suspensions d'HAV: càlcul de la TCID<sub>50</sub>/ml**

El número de partícules víriques infeccioses de les suspensions d'HAV es va quantificar usant el mètode TCID<sub>50</sub>, el qual quantifica la dosi vírica necessària per provocar efecte citopàtic (CPE) en el 50% de les repliques infectades. L'assaig es realitza infectant monocapes de cèl·lules FRhK-4 en un format de placa de 96 pous. El protocol que es va seguir va ser el següent:

- Descartar el medi de creixement de les plaques de 96 pous amb monocapes confluents preparades 3-4 dies previs a la infecció.
- Inocular la placa amb dilucions seriades 1/10 en MEM 0% FBS de la suspensió vírica a titular. Concretament, per cada dilució s'inoculava una columna (8 pous), afegint 20µl a cada pou. Com a control negatiu, s'afegia el mateix volum de MEM 0% SFB als 8 pous de la última columna de la placa.
- Incubar la placa inoculada a 37°C durant 60 minuts en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO<sub>2</sub> a fi de facilitar l'adsorció del virus.



- Afegir MEM amb 2 % de FBSi com a medi post-infecció (p.i)
- Incubar la placa a 37°C en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO<sub>2</sub> durant 10 dies.
- Inspeccionar les cèl·lules i realitzar les lectures de presència/absència de CPE per cada pou inoculat de la placa als 10-11 d.p.i. Fer una lectura addicional i definitiva als 13 dies.
- Calcular la TCID<sub>50</sub> segons la fórmula descrita en el mètode de Behrens i Kärber [8] que es detalla a continuació:

$$\text{LogTCID}_{50} = \text{lr} + 1/2\text{d} - 1 \Sigma (\text{pi}+1)$$

on:

**lr** és el logaritme en base 10 de la dilució més alta que dona el 100% d'efecte citopàtic (CPE)

**d** és el logaritme de la sèrie dilucional

**pi** és la proporció de resposta positiva en les dilucions amb CPE en menys de les 8 rèpliques

D'aquesta manera, el títol infeccions s'expressa com a TCID<sub>50</sub>/ml, tenint en compte que el volum de l'inòcul era de 20µl.

## 7.2 Quantificació mitjançant RT-qPCR de l'HAV

Per a quantificar el RNA de l'HAV es va utilitzar la tècnica de la RT-PCR a temps real (RT-qPCR) d'un fragment de la regió 5'NCR. El protocol que es va seguir és el descrit per Costafreda i col·laboradors l'any 2006 [309]. Per a la seva realització es va utilitzar el kit *RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-qPCR* (Invitrogen™, Life Technologies™) i els primers i la sonda descrits a la **Taula 6**.

Els passos a seguir són:

- Preparar la barreja de reacció per a la RT-qPCR (per pou):

Reactiu	Volum	Concentració final
<b>5X Buffer Reaction mix</b>	5 µl	<b>1X</b>
<b>100 µM primer HAV 68</b> (Sigma Aldrich)	0.125 µl	<b>0.5 µM</b>
<b>100 µM primer HAV 240</b> (Sigma Aldrich)	0.225 µl	<b>0.9 µM</b>
<b>50 µM sonda 150(-) HAV TaqMan®</b> marcada amb FAM™	0.125µl	<b>0.25 µM</b>
<b>Ultrasense Enzim mix</b>	1.25 µl	
<b>H<sub>2</sub>O desionitzada lliure de DNases i RNases</b> (Gibco®, Life Technologies™)	13.275µl	
<b>Extracte d'àcids nucleics (RNA)</b>	5 µl	
<b>Volum total</b>	<b>25 µl</b>	

- Afegir a cada pou 20µl de la mix corresponen i 5µl de la mostra.
- Col·locar la placa a l'aparell de RT-qPCR afegint els següents paràmetres:

Fases de la RT-qPCR	Temperatura	Temps	Cicles
<b>Transcripció reversa</b>	55°C	60'	<b>1X</b>
<b>Desnaturalització inicial/ activació polimerasa</b>	95°C	5'	<b>1X</b>
<b>Desnaturalització</b>	95°C	15''	
<b>Hibridació</b>	60°C	1'	<b>45X</b>
<b>Extensió</b>	65°C	1'	

*La fluorescència es mesura a final de cada cicle*

L'aparell de RT-qPCR utilitzat és el Mx3000P (*Stratagene*) i els resultats de les quantificacions eren analitzats amb el programa *MxPro*, el qual és proporcionat per la mateixa casa comercial de l'aparell.

**Taula 6.** Primers i sonda utilitzats per la RT-qPCR de la regió 5'NCR.

Oligonucleòtid	Seqüència
HAV 68	5' TCACCGCCGTTGCCTAG 3'
HAV 240	5' GGAGAGCCCTGGAAGAAAG 3'
HAV 150 (-)	5' [6FAM]TTAATTCCTGCAGGTCAGG[MGBNFQ] 3'

### 7.3 Quantificació relativa de l'expressió gènica en cèl·lules Huh7-AI

Per quantificar l'expressió relativa de gens en les cèl·lules Huh7-AI infectades amb les poblacions HM175-L0 i HM175-HP de l'HAV, es va posar a punt una RT-qPCR per quantificar el mRNA del gens a analitzar en extractes de cèl·lules no-infectades i infectades.

Les cèl·lules Huh7-AI es van sembrar a una relació de multiplicació de 1:6 en flascons de 25cm<sup>2</sup> de superfície i es van incubar durant 48 hores a 37°C per arribar a la confluència. Les cèl·lules van ser infectades amb una MOI de 5. Paral·lelament, com a control negatiu, es van mantenir flascons sota les mateixes condicions, però sense infectar. Les cèl·lules van ser lisades a les 48 i 72 h p.i. i es va extreure l'RNA total dels lisats amb el *GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)* seguint les instruccions del kit comercial. Es van

realitzar un mínim de 3 experiments independents amb dues rèpliques cadascun per a cada població i temps p.i.

Seguidament, es va dur a terme una RT-qPCR per quantificar l'expressió gènica dels gens d'interès. El kit utilitzat va ser *KiCqStart® One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix™* (Sigma-Aldrich) amb els primers i les sondes *KiCqStart® Probe Assays* (Sigma-Aldrich) pre-dissenyats (**Taula 7**). Com a gen de referència endogen es va utilitzar Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) i tots els gens es van quantificar per triplicat en cada rèplica. Els passos seguits van ser els següents:

- Preparar les dues barreges de reacció per a la RT-qPCR:
  - Barreja per a la quantificació dels gens a analitzar (per pou):

Reactiu	Volum	Concentració final
<b>KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR (2X)</b>	10 µl	<b>1X</b>
<b>10 µM primer FH2</b> (Sigma Aldrich)	0.9 µl	<b>0.45 µM</b>
<b>10 µM primer RH2</b> (Sigma Aldrich)	0.9 µl	<b>0.45 µM</b>
<b>10 µM sonda PH2</b> (Sigma Aldrich)	0.3µl	<b>0.15 µM</b>
<b>H<sub>2</sub>O desionitzada lliure de DNAses i RNAses</b> (Gibco®, Life Technologies™)	2.9µl	
<b>Extracte d'àcids nucleics (RNA)</b>	5 µl	
<b>Volum total</b>	<b>20 µl</b>	

- Barreja per a la quantificació del gen de referència *GAPDH* (per pou):

Reactiu	Volum	Concentració final
<b>KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR (2X)</b>	10 µl	<b>1X</b>
<b>10 µM primer FH2</b> (Sigma Aldrich)	0.9 µl	<b>0.45 µM</b>
<b>10 µM primer RH2</b> (Sigma Aldrich)	0.9 µl	<b>0.45 µM</b>
<b>10 µM sonda PH2</b> (Sigma Aldrich)	0.3µl	<b>0.15 µM</b>
<b>H<sub>2</sub>O desionitzada lliure de DNAses i RNAses</b> (Gibco®, Life Technologies™)	2.9µl	
<b>Extracte d'àcids nucleics (RNA)</b>	5 µl	
<b>Volum total</b>	<b>20 µl</b>	

- Afegir a cada pou 20µl de la mix corresponent i 5µl de la mostra. Cada mostra va ser quantificada per triplicat i per les dues mix per separat.
- Col·locar la placa de 96 pous a l'aparell de RT-qPCR i seguir el següent programa:

Fases de la RT-qPCR	Temperatura	Temps	Cicles
<b>Síntesi cDNA</b>	50°C	20'	<b>1X</b>
<b>Desnaturalització</b>	95°C	1'	<b>1X</b>
<b>Cicle PCR</b>	95°C	5''	<b>40X</b>
	60°C	35''	

*La fluorescència es mesura a final de cada cicle*

L'aparell de RT-qPCR utilitzat per aquesta tesi era el Mx3000P (*Stratagene*) i els resultats de les quantificacions s'analitzaven amb el programa MxPro proporcionat per la mateixa casa comercial de l'aparell.

**Taula 7. Primers i sondes utilitzats per a la quantificació relativa de mRNA gènic en cèl·lules Huh7-AI.** Pre-dissenyats per *KiCqStart® Probe Assays* (*Sigma-Aldrich*).

Oligonucleòtid	Seqüència
<b>SDCBP</b>	Forward 5' AGCTCTCTCAATACACATGGGG 3'
	Reverse 5' AAGGTCTTGCTACCAACTGC 3'
	Probe 5' [6FAM] TGGCCGTGGTTTCTGGT [OQA] 3'
<b>SDC1</b>	Forward 5' CACCATGAGACCTCAACC 3'
	Reverse 5' CCGAGGTTTCAAAGGTGA 3'
	Probe 5' [6FAM] AGCCAAGCTGACCTTCA [OQA] 3'
<b>RAB7A</b>	Forward 5' CACCATGAGACCTCAACC 3'
	Reverse 5' CCGAGGTTTCAAAGGTGA 3'
	Probe 5' [6FAM] AGCCAAGCTGACCTTCA [OQA] 3'
<b>RAB11A</b>	Forward 5' AGAAGCATCCAGGTTGATGC 3'
	Reverse 5' AATAAGGCACCTACAGCTCC 3'
	Probe 5' [6FAM] TGGGACACAGCAGGGCA [OQA] 3'
<b>RAB11C</b>	Forward 5' AAGGAGCTCTATGACCATGC 3'
	Reverse 5' AGCAGTCCATTGTTTTTCAGC 3'
	Probe 5' [6FAM] GCCCACTGAGGAGGCC [OQA] 3'
<b>RAB27A</b>	Forward 5' CATTTCAAGAGCAGGGTTGC 3'
	Reverse 5' GTTTCACCTGTGTTAGCCAGG 3'
	Probe 5' [6FAM] AGGGCGGATCACGAGGT [OQA] 3'
<b>RAB27B</b>	Forward 5' ATCTGATCAAACCTCCTGGCC 3'
	Reverse 5' TAAACCACACGTTTTTCCCG 3'
	Probe 5' [6FAM] TCGGGATTTCAGGGTG [OQA] 3'

<b>RAB35</b>	Forward 5' ATGTTAGCACTGTGGATGGC 3'
	Reverse 5' CTGTCCCAGAATCACCAGC 3'
	Probe 5' [6FAM]ACCGACTCTCCACTTGC[OQA] 3'
<b>TSG101</b>	Forward 5' CTGCCACAACAAGTTCTG 3'
	Reverse 5' CAGAGATGAGAGAGGCTC 3'
	Probe 5' [6FAM] ACCGACTCTCCACTTGC [OQA] 3'
<b>GAPDH</b>	Forward 5' GAAGGAAATGAATGGGCAGC 3'
	Reverse 5' TCTAGGAAAAGCATCACCCG 3'
	Probe 5' [6FAM] ACCGACTCTCCACTTGC [OQA] 3'

Un cop obtinguts els valors de Ct de les RT-qPCR es va fer l'anàlisi d'expressió gènica mitjançant el mètode de comparació de Ct de *Josh Haines i Melissa Kelley, Dharmacon, Lafayette, CO, USA* [310]

Seguint les instruccions del mètode, els valors de Ct dels triplicats de cada mostra es van normalitzar individualment tenint en compte el nivell d'expressió del gen endogen *GAPDH* de la mateixa mostra. Degut a que el valor de les Ct és una mesura proporcional al logaritme negatiu de la concentració de la seqüència diana, per aconseguir un valor d'expressió es va requerir transformar les dades d'expressió. Per tal d'aconseguir el valor de variació (increment o decrement) de cada mostra (*fold change*), les dades van ser normalitzades respecte els resultats obtinguts de les mostres control (cèl·lules no infectades o *non-targeting siRNA*) establertes en cada cas.

Els càlculs realitzats van ser:

1. Normalitzar Ct amb el gen de referència endogen.

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{gen referència endogen en aquest cas el GAPDH})$$

2. Transformació exponencial de l'expressió.

$$\text{Expressió} = 2^{-\Delta Ct}$$

3. Mitjana de les rèpliques i desviació estàndard.

4. Normalitzar respecte el tractament control.

$$\text{Increment } (\Delta\Delta Ct) = 2^{-\Delta Ct} (\text{mostra problema}) / 2^{-\Delta Ct} (\text{mostra control}).$$

## 7.4 Microscòpia confocal

L'estudi de microscòpia confocal de co-localització quantitativa de les poblacions HM175-L0 i HM175-HP amb les proteïnes RAB7A, RAB11A i RAB35 es va realitzar mitjançant un anàlisi d'imatges d'immunofluorescència indirecta sobre cultius de cèl·lules Huh7-AI infectades amb el virus de l'HAV.

### 7.4.1 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per l'HAV i les proteïnes RAB

Per a dur a terme l'estudi de microscòpia confocal es van fer créixer cèl·lules Huh7-AI sembrades a una densitat de  $7 \times 10^4$  cèl·lules/pou en un cobreobjectes *Lab-Tek® Chambered 1.0 Borosilicate Coverglass System Nunc™, Thermo Scientific™*. Un cop confluents (aproximadament 48 hores després) es van infectar amb una MOI de 5. Les infeccions es van parar a les 48 h seguint el següent protocol:

a) Reactius:

- PBS 100mM.
- Solució de fixació: paraformaldehid 4% en PBS i sacarosa 60mM.
- Solució de rentat: PBS amb Glicina 20mM.



- Solució de permeabilització: PBS amb Glicina 20mM i 0.05% TritóX100.
- Solució de bloqueig: PBS amb Glicina 20mM i 1% BSA.
- Solució d'incubació: PBS amb Glicina 20mM, 1% BSA i 0.025% TritóX100.

### b) Procediment:

- Retirar el medi de cultiu.
- Rentar les cèl·lules amb PBS.
- Incubar 15 minuts amb la solució de fixació.
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb PBS.
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb la solució de rentat.
- Incubar 10 minuts amb solució de permeabilització.
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb la solució de rentat.
- Incubar 30 minuts amb solució de bloqueig.
- Incubar 60 minuts amb els anticossos primaris diluïts amb solució d'incubació a 37°C en humitat controlada:
  - 1/800 *Anti-HAV Mouse monoclonal isotype IgG2a 7E7(M40) (Mediagnost)*
  - 1/20 *Anti-RAB7 Rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology)*
  - 1/50 *Anti-RAB11 Rabbit polyclonal (Proteintech)*
  - 1/50 *Anti-RAB35 Rabbit polyclonal (Proteintech).*
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb la solució de rentat.
- Incubar 60 minuts amb els anticossos secundaris diluïts amb solució d'incubació a 37°C en humitat controlada\*:
  - 1/2000 *Goat Anti-Mouse polyclonal IgG H&L Cy3 (Life technologies).*
  - 1/1000 *Goat Anti-Rabbit polyclonal IgG H&L Alexa Fluor 488 (Abcam).*

\*A partir d'aquest pas cal protegir les immunofluorescències de la llum.

- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb la solució de rentat.
- Incubar 15 minuts amb Hoescht 33342 (*Sigma-Aldrich*) a 1 µg/ml diluït amb solució d'incubació a per a la tinció del nucli.
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb PBS.
- Afegir PBS i guardar a 4°C en humitat controlada fins a la seva observació.
- Observar les immunofluorescències al microscopi confocal.

Com a controls de l'experiment es van utilitzar anticossos primaris sols, anticossos secundaris sols, un primari amb un secundari dirigit contra IgGs d'un altre animal i una mostra sense anticossos per testar l'autofluorescència.

La captura d'imatges es va realitzar amb el microscopi confocal *Zeiss LSM 880* dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) utilitzant un objectiu Plan-Apochromat63.0x1.40 OIL a una resolució de 1024 x 1024 i zoom 2. La distància entre talls va ser de 0,12µm. Els làsers utilitzats van ésser els de 488nm, 561nm i 405nm. Durant tot l'anàlisi es va mantenir un *Threshold* pel soroll de fons de 10 per a totes les imatges. Per aquest estudi es van analitzar un mínim de tres experiments independents i es van prendre 6-7 imatges representatives de cadascuna de les colocalitzacions.

#### 7.4.2 Ús del software d'anàlisi

Les imatges del microscopi confocal s'obtenen dividides per canals, corresponent cadascun d'ells a un làser (p.ex canal 1: làser 561nm). Les imatges es deconvolucionen i es preparen per al seu anàlisi amb el software *Hyugens Essential v. 3.7.1 p4*. Aquesta deconvolució consisteix en la restauració de les imatges obtingudes per microscòpia eliminant el soroll produït per l'energia

despresa del flux de fotons dels làsers. També, defineix els objectes de les imatges tornant a la ubicació original la llum dispersa. Un cop s'obtenen les imatges deconvolucionades, es realitza el càlcul de la co-localització.

La co-localització està descrita com la superposició espacial, amb les mateixes coordenades, entre dues senyals de fluorescència generades per dos fluorocroms que marquen dues dianes diferents. La co-localització quantitativa ens permet examinar els antigens d'interès en imatges d'immunofluorescència obtingudes per microscòpia confocal mitjançant el càlcul de determinats coeficients [311]. El programa informàtic d'anàlisi emprat en aquest treball és l'Image J.

Hi ha moltes tècniques diferents per adquirir les imatges i moltes raons per les quals es vol fer un anàlisi de co-localització. Per aquestes raons existeixen diferents mètodes per estudiar la co-localització. No existeix el mètode òptim universal, cadascun té els seus propis avantatges i desavantatges. Per tant, s'ha de trobar el mètode que pot ser més adequat per les nostres dades. En aquest treball ens interessa el comportament del virus de l'HAV i de les proteïnes RAB, i degut a la diferència d'abundància en el marcatge de cada antigen, es va decidir utilitzar els coeficients de Manders M1 i M2 per a l'anàlisi quantitatiu, els quals proporcionen un valor independent per a cada canal.

El coeficients de Manders M1 i M2 ens expressen el grau o percentatge de co-localització dels píxels d'interès per a cada canal. Aquest càlcul no està influenciat per les intensitats dels dos canals, però sí pel soroll de la imatge i el *Threshold* establert. Per això és important realitzar la deconvolució de les imatges i establir sempre el mateix nivell de *Threshold* [311].

El coeficient de Manders M1 és el resultat del sumatori de la intensitat dels píxels del canal 1 que correspon al làser 561 (HAV,vermell) que co-localitzen, és a dir, que es troben en les mateixes coordenades, amb el canal 2 que correspon al làser 488 (RAB, verd), dividit entre el sumatori de les intensitats dels píxels del canal 1.

$$M1 = \frac{\sum_i S1_{i,coloc}}{\sum_i S1_i}$$

*S1: Intensitat de la senyal dels píxels del canal 1.*

En canvi, el coeficient de Manders M2 és el resultat del sumatori de la intensitat dels píxels del canal 2, làser 488 (RAB, verd) que co-localitzen amb el canal 1, el làser 561 (HAV, vermell), dividit entre el sumatori de les intensitats dels píxels del canal 2.

$$M2 = \frac{\sum_i S2_{i,coloc}}{\sum_i S2_i}$$

*S2: Intensitat de la senyal dels píxels del canal 2.*

Els resultats obtinguts variaran de 0 a 1, on el 0 reflecteix imatges no superposades i l'1, el 100% de co-localització entre ambdós canals. Per tant, M1 és un bon indicador de la proporció del senyal vermell coincident amb un senyal del canal verd sobre la seva intensitat total i M2 ho és de la proporció del senyal verd coincident amb un senyal del canal vermell sobre la seva intensitat total.

## 7.5 Silenciament gènic de les proteïnes RAB7A, RAB11A i RAB35

El silenciament dels gens RAB es va dur a terme mitjançant la transfecció de siRNA amb el sistema *SMART pool ON-TARGETplus siRNA* (Dharmacon, GE Healthcare) dirigit contra els gens RAB7A, RAB11A i RAB35 individualment. Paral·lelament, com a control de cèl·lules no silenciades es va utilitzar un *SMART pool ON-TARGETplus Non-targeting siRNA* (Dharmacon, GE Healthcare). Primerament, es van sembrar cèl·lules Huh7-A1 a una densitat de  $6,5 \times 10^4$  cèl·lules/pou en plaques de 24 pous i es van fer créixer durant 24 hores a 37°C en atmosfera enriquida amb 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriorment, es va realitzar el protocol de transfecció detallat a continuació. La concentració final dels dos *pools* de siRNA utilitzats va ésser de 50nM pel siRAB7A i siRAB11A i de 100nM pel siRAB35, degut a que amb 50nM no aconseguíem un silenciament suficient. Es varen també fer silenciaments dobles combinant mix de siRNA a una concentració final de 50nM en tots els casos. A les 48 hores post-transfecció, les cèl·lules es van infectar amb les soques L0 i HP utilitzant una MOI de 5, seguint el protocol detallat en l'apartat 7.1.6. Cèl·lules sense infectar van servir com a control negatiu. Es van realitzar un total de 2 experiments amb 3 rèpliques cadascun per cada gen i població d'HAV.

Procediment de transfecció:

- Diluir els siRNA a 5 µM en H<sub>2</sub>O desionitzada lliure de RNases (*Gibco®*, *Life Technologies™*)
- En dos tubs per separat diluir els siRNA i el reactiu de transfecció DharmaFECT 4 amb medi de cultiu lliure de sèrum:

- Tub 1:
  - En el cas de voler una concentració final de 50 nM del siRNA: preparar 50 µl / pou de siRNA, afegint 2,5 µl de la solució 5 µM de siRNA i 47,5 µl de medi de cultiu lliure de sèrum.
  - En el cas de voler una concentració final de 100 nM del siRNA: preparar 50 µl / pou de siRNA, afegint 5 µl de la solució 5 µM de siRNA i 45 µl de medi de cultiu lliure de sèrum.
- Tub 2: preparar 50 µl / pou del reactiu de transfecció DharmaFECT 4, afegint 0,25 µl del reactiu i 49,75 µl de medi de cultiu lliure de sèrum.
- Barrejar acuradament les dues solucions amb la pipeta i incubar 5 minuts a temperatura ambient.
- Afegir el contingut del tub 1 al tub 2 per aconseguir un volum final de 100 µl (1:1)
- Barrejar acuradament amb la pipeta i incubar 20 minuts a temperatura ambient.
- Afegir 400 µl / pou de medi de cultiu al 2% SFB sense antibiòtic, per obtenir un volum final de solució de transfecció de 500 µl / pou a una concentració final de 50 o 100nM de siRNA depenent del siRAB a silenciar.
- Retirar el medi de cultiu dels pous de la placa de 24 i afegir 500 µl / pou de la solució de transfecció
- Incubar les cèl·lules a 37°C en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO<sub>2</sub> durant 48 hores.

Per fer l'anàlisi de l'expressió gènica es va seguir el mateix mètode de quantificació relativa detallat a l'apartat 7.3.

## 7.6 Polarització de cèl·lules Huh7-AI *in vitro*

Per a polaritzar les cèl·lules Huh7-AI es va seguir el següent procediment. Es van sembrar  $4,5 \times 10^5$  cèl·lules/cm<sup>2</sup> de superfície en *transwells* de policarbonat de 0,4 µm d'inserts (*Corning™ Transwell® 12-well plate*), en *coverglasses* (*Lab-Tek® Chambered 1.0 Borosilicate Coverglass System Nunc™ 8 well plate, Thermo Scientific™*) o en flascons de 25cm<sup>2</sup> de superfície. El medi de cultiu utilitzat era MEM amb 15% de FBS. Un cop les cèl·lules assolien la confluència, es refrescava el medi cada 48 hores suplementant-lo amb un 1% de DMSO, durant un total de 14 dies mantenint les cèl·lules a 37°C i en el cas dels *transwells* i *coverglasses*, en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO<sub>2</sub> en el cas dels *transwells*.

### 7.6.1 Immunofluorescència indirecta de doble marcatge per cèl·lules Huh7-AI polaritzades

Per confirmar la polarització es va posar a punt una immunofluorescència indirecta de doble marcatge de les unions estretes (*tight junctions*), on es marcava la proteïna ZO-1 (*zonula occludens protein-1*) de la membrana apical i l'ATPasa de sodi-potassi (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPasa) de la membrana basolateral dels hepatòcits en cèl·lules crescudes en *coverglasses* (*Lab-Tek® Chambered 1.0 Borosilicate Coverglass System Nunc™ 8 well plate, Thermo Scientific™*). El protocol que es va seguir és el següent:

- a) Reactius:
  - PBS 100mM.
  - Solució de fixació: paraformaldehid 4% en PBS i sacarosa 60mM.
  - Solució de rentat: PBS amb Glicina 20mM.
  - Solució de permeabilització: PBS amb Glicina 20mM i 0.05% TritóX100.

- Solució de bloqueig: PBS amb Glicina 20mM i 1% BSA.
- Solució d'incubació: PBS amb Glicina 20mM, 1% BSA i 0.025% TritóX100.

b) Procediment:

- Retirar el medi de cultiu.
- Rentar les cèl·lules amb PBS.
- Incubar 15 minuts amb la solució de fixació.
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb PBS.
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb la solució de rentat.
- Incubar 15 minuts amb solució de permeabilització.
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb la solució de rentat.
- Incubar 30 minuts amb solució de bloqueig.
- Incubar 60 minuts amb els anticossos primaris diluïts amb solució d'incubació corresponents a 37°C en humitat controlada:
  - 1/100 Anti-ZO-1 rat polyclonal (Santa Cruz Biotechnology).
  - 1/100 Anti- Na+K+-ATPasa Mouse monoclonal (Abcam)
  - 1/20 Anti-RAB7 Rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology)
  - 1/50 Anti-RAB11 Rabbit polyclonal (Proteintech)
  - 1/50 Anti-RAB35 Rabbit polyclonal (Proteintech).
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb la solució de rentat.
- Incubar 60 minuts amb els anticossos secundaris diluïts amb solució d'incubació corresponents a 37°C en humitat controlada\*:
  - 1/200 Goat Anti-Mouse polyclonal IgG Cy3 (Life technologies)
  - 1/200 Goat Anti-Rabbit polyclonal IgG H&L Alexa Fluor 488 (Abcam)
  - 1/200 Goat Anti-Rat polyclonal IgG Cy3 (Abcam)

\*A partir d'aquest pas cal protegir les immunofluorescències de la llum.



- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb la solució de rentat.
- Incubar durant 15 minuts amb solució d'incubació + Hoescht 33342 (*Sigma-Aldrich*) a 1 µg/ml per a la tinció del nucli.
- Rentar 2 cops durant 5 minuts amb PBS.
- Afegir PBS i guardar a 4°C en humitat controlada fins a la seva observació.
- Observar les immunofluorescències al microscopi confocal.

Com a controls de l'experiment es van utilitzar anticossos primaris sols, anticossos secundaris sols, un primari amb un secundari dirigit contra IgGs d'un altre animal, i una mostra sense anticossos per testar l'autofluorescència.

Les imatges d'immunofluorescència indirecta van ser agafades tal i com es detalla a l'apartat **7.4.1**, amb la única diferència que per a la seva visualització es va utilitzar un zoom 1 i es van prendre les imatges amb una distància entre talls de 0,5 µm. Per aquest estudi, igual que en les cèl·lules no diferenciades, es van realitzar un mínim de tres experiments independents i es van prendre 6-7 imatges representatives de cadascuna de les co-localitzacions.

### **7.6.2 Infecció de monocapes polaritzades de cèl·lules Huh7-AI en transwells**

Les cèl·lules Huh7-AI polaritzades en monocapa crescudes en un sistema de *transwell* de 12 pous (*Corning™ Transwell™ Multiple Well Plate with Permeable Polycarbonate Membrane Inserts*) es van utilitzar per avaluar l'entrada i sortida vectorial d'ambdues poblacions. Primerament, es van sembrar cèl·lules Huh7-AI a una densitat  $4,5 \times 10^5$  cèl·lules/pou i es van deixar polaritzar seguint el protocol en l'apartat anterior **7.6**. Un cop polaritzades, es

van infectar amb les dues poblacions d'HAV, la parental L0 i la HP, amb una MOI de 5 a través dels compartiments apical i basolateral del sistema de *transwell*. Es van deixar incubar 90 minuts a 37°C en atmosfera enriquida amb CO<sub>2</sub> per a l'adsorció del virus. Seguidament, es va retirar l'inòcul, es va netejar curosament la monocapa i es va deixar incubar amb medi al 2% de FBS a 37°C en una atmosfera enriquida amb un 5% en CO<sub>2</sub>. Posteriorment, es van recollir els sobrenedants d'ambdós compartiments a intervals d'una hora fins a les 3 h p.i. per valorar la transcitosis. Més endavant, es van recollir també els sobrenedants als 5 i 7 dies p.i. El títol infecció dels sobrenedants es van quantificar mitjançant l'assaig de TCID<sub>50</sub>. El títol a temps 0 correspon al títol després de 3 hores d'infecció i dos rentats, el qual es va sostreure dels títols obtinguts els dies 5 i 7 p.i. per observar l'augment. Es van realitzar un mínim de 5 experiments independents amb 3 rèpliques cadascun i per cadascuna de les poblacions del virus.

## **7.7 Alineament de seqüències mitjançant el programa Mega**

L'alineament de les seqüències de la proteïna VP2 de l'HAV es va fer a partir de 132 seqüències de VP2 representatives de les 9 espècies d'hepatovirus i recuperades de 34 espècies diferents de mamífers disponibles al GenBank (EU526089, M20273, AY644676, AB279732, AB300205, M14707, HQ246217, KX088647, M59286, D00924, EU140838, KR703607, MG181943, KT452631-KT452747).

Pel que fa a l'alineament de les seqüències de la proteïna VP1, aquest es va fer a partir de 28 seqüències de VP1 representatives de les 9 espècies diferents d'hepatovirus disponibles al GenBank (EU526089, M20273, AY644676, AB279732, AB300205, HQ246217, M14707, KX088647, M59286, D00924,

EU140838, NC\_027818, KR703607, MG181943, KT452637, KT452641, KT452644, KT452658, KT452661, KT452685, KT452691, KT452695, KT452698, KT452714, KT452729, KT452730, KT452735, KT452742).

Tots els fitxers de GenBank descarregats van ser utilitzats en format *Fasta* i van ser afegits al programa Mega versió 11 (Tamura K, Stecher G, and Kumar S 2021), el qual va ser l'utilitzat per generar alineaments. A partir dels alineaments obtinguts, es van analitzar les mutacions que eren del nostre interès.

### **7.8 ELISA sandvitx indirecta per a la caracterització antigènica de càpsides de les poblacions L0 i HP**

Per tal de caracteritzar antigènicament els diferents tipus de partícules de la població L0 i HP, es va posar a punt un assaig de sandvitx ELISA indirecta, on es va fer ús d'un sèrum convalescent humà no etiquetat i peroxidasa-etiquetat per la captura i detecció, respectivament. Els antígens testats eren càpsides nues de L0 o HP obtingudes a partir de SN de cèl·lules FRhK-4 lisats amb NP40. A mode de control negatiu es va utilitzar com a antigen de captura sobrenedant de cèl·lules FRhK-4 no infectades.

Tots els assajos d'ELISA es van realitzar en plaques de poliestirè de 96 pous (*Sigma Aldrich*) i el volum de reactius per pou en cada pas era de 50µl, exceptuant el volum de la solució de rentat que era de 100µl, per assegurar-nos que la placa era rentada correctament. El protocol que es va seguir és el següent:

a) Reactius:

- Tampó de cobertura: 35nM de bicarbonat sòdic i 15mM de carbonat sòdic a un pH de 9,6.
- Solució de rentat (PTB): PBS (pH 7,2) amb 3mg/ml de BSA i 0,05% Tween20.
- Tampó de detecció (tampó TMB): 1-Step Ultra TMB (*Sigma Aldrich*).
- Tampó neutralitzant: 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

b) Procediment:

- Afegir l'anticòs humà convalescent (anti-HAV IgG) diluït amb el tampó de cobertura a una concentració de 0,5 µg/ml.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Bloquejar els llocs d'unió inespecífics afegint tampó de rentat.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir aproximadament 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> de virus, o el corresponent sobrenedant de cèl·lules FRhK-4, els quals prèviament havien estat lisats amb un 3% de NP40 durant 30 minuts a 37°C, seguit de 3 cicles de sonicació a 60W durant 30 segons i posteriorment, amb 3 cicles de congelació-descongelació a -80°C i 37°C, respectivament.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir l'anticòs convalescent humà (anti-HAV IgG) conjugat amb peroxidasa (*Biokit*) diluït en solució de rentat a 1/1400.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.

- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir el tampó de detecció (TMB), el qual és el substrat cromogènic.
- Incubar la placa durant aproximadament 20 minuts a temperatura ambient en humitat controlada.
- Parar la reacció afegint  $H_2SO_4$  2M abans que el control negatiu agafi color.
- Llegir la placa a 450nm ( $DO_{492}$ ) amb el lector ASYS UVM340.

### **7.9 Inoculació subcutània d'immunògens en ratolins BALB/C**

La inoculació subcutània d'antígens vírics en ratolins BALB/C es va fer a partir de les suspensions concentrades de l'HAV produïdes tal i com es detalla en l'apartat 7.1.5. Es va inocular 7,5Log TCID<sub>50</sub> a 8 grups de ratolins femella de 15 setmanes d'edat segons el següent disseny:

- Grup 1: L0 nu (L0n).
- Grup 2: L0 quasi-embolcallat (L0e).
- Grup 3: HP quasi-embolcallat (HPe).
- Grup 4: HP quasi-embolcallat i amb actinomicina D (HPeA).
- Grup 5: HP nu amb adjuvant (HPn).
- Grup 6: HP nu amb actinomicina D i adjuvant (HPnA).
- Grup 7: ovoalbúmina (OVA), que correspon a un control negatiu (control 1).
- Grup 8: pseudo-embolcalls (PE), és a dir, sobrenedant de cèl·lules sense infectar, que correspon a un control negatiu (control 2).

Previ a la inoculació dels immunògens, es va realitzar un anàlisi estadístic amb el Programa de l'Oficina Avaluadora de Projectes de la Universitat Miguel Hernández D'Elx (Alacant) per determinar el nombre d'animals que calia utilitzar per obtenir resultats científicament rellevants. A partir d'aquest anàlisi es va calcular que s'havien d'inocular un total de 96 ratolins femella de 15 setmanes d'edat, repartits aleatòriament en 12 ratolins per cada un dels grups experimentals. Addicionalment, es van inocular un total de 16 ratolins mascles de 15 setmanes d'edat, repartits en 8 ratolins pels grups experimentals 3 i 5. Per facilitar la manipulació de tants animals d'experimentació, es va decidir dividir la part experimental en 2 cohorts de similar mida i amb representants de tots els grups experimentals.

A més, es va afegir una tercera cohort d'immunitzacions de ratolins, on es va considerar analitzar la immunogenicitat generada per un preparat vacunal que combinava la partícula quasi-embolcallada amb la presència de l'adjuvant hidròxid d'alumini. Aquesta cohort només es va realitzar amb immunògens de la població HP i contenia els següents 5 grups d'experimentació:

- Grup 1: HP nu ( $HP_n$ ) en absència d' $Al(OH)_3$ .
- Grup 2: HP nu ( $HP_n$ ) administrat amb  $Al(OH)_3$ .
- Grup 3: HP quasi-embolcallat ( $HP_e$ ).
- Grup 4: HP quasi-embolcallat i administrat amb  $Al(OH)_3$ .
- Grup 5: pseudo-embolcalls (PE), corresponent al grup control.

Es van inocular un total de 7 ratolins femelles de 15 setmanes d'edat per cada un dels grups d'immunògens.

En les tres cohorts, els ratolins eren inoculats per via subcutània amb  $5 \times 10^7$  unitats  $TCID_{50}$  de cada tipus de partícula vírica en  $50 \mu l$  de tampó amortidor

HEPES, pH 6,0 i, en el cas dels grups experimentals amb partícules nues, es barrejaven amb 50µl d'adjuvant hidròxid d'alumini. Aquest inòcul inicial era reforçat als dies 14, 28 i 42. Les mostres de sèrum s'obtenien després de sagnar els ratolins per la vena caudal als dies 0, 28, 42 i 56. Addicionalment, en la tercera cohort també s'obtenien mostres al dia 63. Posteriorment, els ratolins eren sacrificats el dia 56, en el cas de les dues primeres cohorts, i el dia 63 post-inoculació, en el cas de la tercera cohort.

Els experiments amb animals d'experimentació es van dur a terme sota condicions de Bioseguretat de tipus II en els estabularis de la Unitat d'Experimentació Animal de la Facultat de Farmàcia (CCiTUB), en col·laboració amb el Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Facultat de Farmàcia. Els animals van mantenir-se constantment en instal·lacions especials, ambientals, socials i sanitàries adequades, així com també es van realitzar controls rutinaris per garantir el benestar animal.

### **7.10 Caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en ratolins BALB/C**

Per tal de poder calcular el títol d'anticossos anti-HAV en les diferents mostres obtingudes de sèrum dels ratolins inoculats amb els diferents productes, es va posar a punt un assaig de sandvitx ELISA indirecta, on es feia ús d'un sèrum convalescent humà per la captura. Els antígens testats eren càpsides nues de L0 o HP.

### 7.10.1 ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV IgG totals

Els sèrums provinents dels ratolins immunitzats obtinguts al dia 0, 28, 42, 56 i 63 post-infecció, van ser analitzats mitjançant una ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV. Altra vegada, a mode de control negatiu s'utilitzava com a antigen de captura sobrenedant de cèl·lules FRhK-4 no infectades i com a anticòs primari, sèrum de ratolins immunitzats amb aquest sobrenedant, corresponent al grup 8 i 5 d'immunització de la segona i tercera cohort, respectivament.

Tots els assajos d'ELISA es van realitzar en plaques de poliestirè de 96 pous (Sigma Aldrich), i el volum afegit per pou en cada pas era de 50µl, exceptuant el volum de la solució de rentat que era de 100µl, per assegurar-nos que la placa era rentada correctament. El protocol que es va seguir és el següent:

c) Reactius:

- Tampó de cobertura: 35nM de bicarbonat sòdic i 15mM de carbonat sòdic a un pH de 9,6.
- Solució de rentat (PTB): PBS (pH 7,2) amb 3mg/ml de BSA i 0,05% Tween20.
- Tampó de detecció (tampó TMB): 1-Step Ultra TMB (*Sigma Aldrich*).
- Tampó neutralitzant: 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

d) Procediment:

- Afegir l'anticòs humà anti-HAV IgG diluït amb el tampó de cobertura a una concentració de 0,5 µg/ml.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.



- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Bloquejar els llocs d'unió inespecífics afegint tampó de rentat.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir aproximadament  $10^6$  TCID<sub>50</sub> de virus o sobrenedant de cèl·lules FRhK-4, els quals prèviament havien estat lisats amb un 3% de NP40 durant 30 minuts a 37°C, seguit de 3 cicles de sonicació a 60W durant 30 segons i posteriorment, amb 3 cicles de congelació-descongelació a -80°C i 37°C, respectivament.
- Incubar la placa durant 3 hores a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir dilucions seriades dels sèrums a testar amb solució de rentat.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir l'anticòs anti-IgG de ratolí conjugat amb peroxidasa (*Sigma Aldrich*) diluït en solució de rentat a 1/40,000.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir el tampó de detecció (TMB), el qual és el substrat cromogènic.
- Incubar la placa durant aproximadament 20 minuts a temperatura ambient en humitat controlada.
- Parar la reacció afegint H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M abans que el control negatiu agafi color.
- Llegir la placa a 450nm (DO<sub>492</sub>) amb el lector ASYS UVM340.

Un sèrum de ratolí era considerat positiu en el reconeixement del virus quan el valor mig d'absorbància (A) era major que el límit de detecció (Ld1) sumat al segon límit de detecció (Ld2). El Ld1 es va establir com la mitja + 3SD dels valors de reconeixement de sobrenedant de cèl·lules FRhK-4 no infectades amb el sèrum anti-OVA (corresponent al grup control 1). Els valors de reconeixement de la càpsida pel sèrum anti-HAV (grups inoculats amb HAV com a immunogen) per sota aquest Ld1 eren considerats negatius. El Ld2 es va establir com la resta de la mitjana dels valors de reconeixement de la càpsida amb el sèrum anti-PE a cada un dels valors positius del primer tall.

### **7.10.2 ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos específic anti-HAV IgG1 i IgG2a**

Els sèrums provinents dels ratolins immunitzats obtinguts al dia 56 post-infecció, van ser analitzats també mitjançant una ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV IgG1 i IgG2a. El procediment seguit és molt similar al de l'apartat **7.10.1**, però presenta lleugeres variacions:

a) Reactius:

- Tampó de cobertura: 35nM de bicarbonat sòdic i 15mM de carbonat sòdic a un pH de 9,6.
- Solució de rentat (PTB): PBS (pH 7,2) amb 3mg/ml de BSA i 0,05% Tween20.
- Tampó de conjugació: extravidina-peroxidasa (*Sigma Aldrich*).
- Tampó de detecció (tampó TMB): 1-Step Ultra TMB (*Sigma Aldrich*).
- Tampó neutralitzant: 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

b) Procediment:

- Afegir l'anticòs humà anti-HAV IgG diluït amb el tampó de cobertura a una concentració de 0,5 µg/ml.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Bloquejar els llocs d'unió inespecífics afegint tampó de rentat.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir aproximadament 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> de virus o sobrenedant de cèl·lules FRhK-4, els quals prèviament havien estat lisats amb un 3% de NP40 durant 30 minuts a 37°C, seguit de 3 cicles de sonicació a 60W durant 30 segons i posteriorment, amb 3 cicles de congelació-descongelació a -80°C i 37°C, respectivament.
- Incubar la placa durant 3 hores a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir dilucions seriades dels sèrums a testar amb solució de rentat.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir l'anticòs anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratolí conjugat amb biotina (*Sigma Aldrich*) diluït en solució de rentat a 1:250,000.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir el tampó extravidina-peroxidasa, perquè s'uneixi a la biotina.
- Incubar durant 30 minuts a 37°C en humitat controlada.

- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir el tampó de detecció (TMB), el qual és el substrat cromogènic.
- Incubar la placa durant aproximadament 20 minuts a temperatura ambient en humitat controlada.
- Frenar la reacció afegint H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M abans que el control negatiu agafi color.
- Llegir la placa a 450nm (DO<sub>492</sub>) amb el lector ASYS UVM340.

### **7.10.3 Tècnica de neutralització de la infectivitat *in vitro* per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV neutralitzants**

La capacitat dels sèrums de neutralitzar la infectivitat *in vitro* de les dues soques d'HAV, HM175-L0 i HM175-HP, va ser caracteritzada mitjançant la tècnica de neutralització de la infectivitat *in vitro*. A mode de control negatiu de l'assaig de neutralització es va utilitzar sèrums del grup control inoculats amb PE. Es van seguir els següents passos:

- Lisar el virus amb un 3% de NP40, tal i com es detalla en l'apartat **7.10.1**.
- Diluir el sèrum de ratolí i l'HAV en un volum final de 100µl de MEM 0% i a una concentració final del virus de 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>. Per a cada sèrum s'assagen les dilucions 1:10 i 1:50.
- Incubar la mix durant 3 hores a 37°C en agitació.
- Titulació de cada una de les suspensions víriques tal i com es descriu en l'apartat **7.1.7**.

Un cop obtingut el títol víric per a cada una de les suspensions víriques assajades, la neutralització de la infectivitat *in vitro* d'HAV es va expressar com

a índex de neutralització (IN). L'IN s'entén com el logaritme decimal de la reducció del títol del control negatiu ( $N_c$ ) respecte al títol del sèrum ( $N_s$ ); ( $IN = \text{Log}_{10} (N_c - N_s)$ ). Aquest valor ens indica quin és el número de virus neutralitzats. La capacitat de neutralització també es pot expressar com el  $\text{Log}_{10}$  del nombre d'unitats per ml de sèrum capaços de neutralitzar el 50% i 90% de  $1 \times 10^5$  unitats  $\text{TCID}_{50}$  en un 50% de les rèpliques ( $\text{Log}_{10} 50N_{50}$  U/ml i  $\text{Log}_{10} 90N_{50}$  U/ml, respectivament).

### **7.11 Inoculació subcutània d'immunògens en porcs Landrace x Large White**

La inoculació subcutània d'antígens vírics en porcs Landrace x Large White es va fer a partir de les suspensions concentrades de l'HAV produïdes tal i com es detalla en l'apartat 7.1.5. En total es van inocular  $2,5 \times 10^8$   $\text{TCID}_{50}$  només de la població HP, ja que és la base d'una vacuna alternativa i en els estudis previs en ratolins, es va observar que era un bon immunogen. A més, es va contemplar afegir un grup, on es pogués analitzar la immunogenicitat generada per un preparat vacunal que en comptes d'afegir-li l'adjuvant hidròxid d'alumini, se li afegís CAF01, el qual és un adjuvant en estat d'experimentació amb elevades capacitats d'induir la resposta Th1 en ratolins, porcs i humans [312]. Com a control positiu es va utilitzar la inoculació de la vacuna HAVRIX i com a control de la resposta immune la inoculació d'una proteïna recombinant. Segons aquestes característiques, es van dissenyar 6 grups experimentals d'inoculació:

- Grup 1: HP quasi-embolcallat sense adjuvant ( $\text{HP}_e$ ).
- Grup 2: HP nu sense adjuvant ( $\text{HP}_n$ ).
- Grup 3: HP quasi-embolcallat administrat amb l'adjuvant  $\text{Al}(\text{OH})_3$  Alhydrogel ( $\text{HP}_e + \text{Al}(\text{OH})_3$ ).

- Grup 4: HP quasi-embolcallat administrat amb l'adjuvant CAF01® (HP<sub>e</sub> + CAF01).
- Grup 5: vacuna comercial HAVRIX-1440 (1440 unitats d'ELISA per dosis en hidròxid d'alumini) (HAVRIX), corresponent al grup control positiu.
- Grup 6: 50µg de p32 recombinant administrat amb l'adjuvant CAF01® (p32 + CAF01), corresponent al grup control negatiu.

Es van inocular un total de 36 porcs de 8 setmanes, repartits aleatòriament en 6 porcs per cada un dels grups experimentals.

Els porcs eren inoculats per via subcutània amb  $2,5 \times 10^8$  unitats TCID<sub>50</sub> de cada tipus de partícula vírica en 2ml de tampó amortidor HEPES, pH 6,0 i, en el cas dels grups experimentals amb partícules nues, es barrejaven amb l'adjuvant Alhydrogel o CAF01®. Aquest inòcul inicial era reforçat amb 1 dosis més el dia 30 després de la inoculació inicial. Les mostres de sèrum s'obtenien després de sagnar els porcs per la vena jugular externa als dies 0, 28, 42 i 56. Els porcs eren sacrificats el dia 56 post inoculació per a l'obtenció de la melsa que serviria per estudiar la resposta immune cel·lular.

Aquesta part de la tesis es duia a terme a sota condicions de Bioseguretat de tipus II en els estabularis de l'IRTA-CReSA, en col·laboració amb el Departament de Sanitat Animal. Els animals van mantenir-se constantment en instal·lacions especials, ambientals, socials i sanitàries adequades, així com també es van realitzar controls rutinaris per garantir el benestar animals.

## **7.12 Caracterització de la capacitat immunogènica de l'HAV en porcs Landrace x Large White**

Per tal de poder calcular el títol d'anticossos anti-HAV en les diferents mostres obtingudes, es va posar a punt un assaig de sandvitx ELISA indirecta, on es feia ús d'un sèrum convalescent humà per la captura. Els antigens testats eren càpsides nues de L0 o HP, és a dir, testant l'antigen heteròleg o homòleg, respectivament.

### **7.12.1 ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV IgG totals**

Els sèrums provinents dels porcs immunitzats obtinguts al dia 0, 28, 42 i 56 post-infecció, van ser analitzats mitjançant una ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos totals anti-HAV. A mode de control negatiu s'utilitzava com a antigen de captura sobrenedant de cèl·lules FRhK-4 no infectades i com a anticòs primari, sèrum de porcs immunitzats amb p32 recombinant, corresponent al grup 6 d'immunització.

El títol d'anticossos IgG totals anti-HAV en les diferents mostres obtingudes va ser quantificat mitjançant un assaig d'ELISA sandvitx indirecte seguint el protocol detallat en l'apartat **7.10.1**, però amb petites variacions. El protocol que es va seguir és el següent:

- a) Reactius:
  - Tampó de cobertura: 35nM de bicarbonat sòdic i 15mM de carbonat sòdic a un pH de 9,6.
  - Solució de rentat (PTB): PBS (pH 7,2) amb 3mg/ml de BSA i 0,05% Tween20.

- Tampó de detecció (tampó TMB): 1-Step Ultra TMB (*Sigma Aldrich*).
- Tampó neutralitzant: 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

e) Procediment:

- Afegir l'anticòs humà anti-HAV IgG diluït amb el tampó de cobertura a una concentració de 0,5 µg/ml.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Bloquejar els llocs d'unió inespecífics afegint tampó de rentat.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir aproximadament 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> de virus o sobrenedant de cèl·lules FRhK-4, els quals prèviament havien estat lisats amb un 3% de NP40 durant 30 minuts a 37°C, seguit de 3 cicles de sonicació a 60W durant 30 segons i posteriorment, amb 3 cicles de congelació-descongelació a -80°C i 37°C, respectivament.
- Incubar la placa durant 3 hores a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir dilucions seriades dels sèrums a testar en solució de rentat.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir l'anticòs anti-IgG de porc produït en conill i conjugat amb peroxidasa (*Sigma Aldrich*) diluït en solució de rentat a 1/20,000.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.



- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir el tampó de detecció (TMB), el qual és el substrat cromogènic.
- Incubar la placa durant aproximadament 20 minuts a temperatura ambient en humitat controlada.
- Parar la reacció afegint  $H_2SO_4$  2M abans que el control negatiu agafi color.
- Llegir la placa a 450nm ( $DO_{492}$ ) amb el lector ASYS UVM340.

El grup control immunitzat amb sobrenedant de cèl·lules FRhK-4 no es va realitzar en els experiments amb porcs, per aquesta raó, un sèrum de porc era considerat positiu en el reconeixement del virus quan l'absorbància (A) era major que el límit de detecció (Ld1). El Ld1 s'obtenia aplicant l'algoritme  $Ld1 = g + (3 \times SD)$ , on g correspon al valor mig d'absorbància dels sèrums provinents de porcs inoculats amb p32 recombinat + CAF01 (control negatiu) i SD a la desviació estàndar dels mateixos valors.

### **7.12.2 ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos específic anti-HAV IgG1 i IgG2a**

Els sèrums provinents dels porcs immunitzats obtinguts al dia 56 post-infecció, van ser analitzats també mitjançant una ELISA sandvitx indirecta per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV IgG1 i IgG2a. El procediment a seguir és molt similar al de l'apartat **7.10.2**, però presenta lleugeres variacions. Es va seguir el següent protocol:

c) Reactius:

- Tampó de cobertura: 35nM de bicarbonat sòdic i 15mM de carbonat sòdic a un pH de 9,6.
- Solució de rentat (PTB): PBS (pH 7,2) amb 3mg/ml de BSA i 0,05% Tween20.
- Tampó de detecció (tampó TMB): 1-Step Ultra TMB (*Sigma Aldrich*).
- Tampó neutralitzant: 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

d) Procediment:

- Afegir l'anticòs humà anti-HAV IgG diluït en el tampó de cobertura a una concentració de 0,5 µg/ml.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Bloquejar els llocs d'unió inespecífics afegint tampó de rentat.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir aproximadament 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> de virus o sobrenedant de cèl·lules FRhK-4, els quals prèviament havien estat lisats amb un 3% de NP40 durant 30 minuts a 37°C, seguit de 3 cicles de sonicació a 60W durant 30 segons i posteriorment, amb 3 cicles de congelació-descongelació a -80°C i 37°C, respectivament.
- Incubar la placa durant 3 hores a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir dilucions seriades dels sèrums a testar amb solució de rentat.
- Incubar la placa tota la nit a 4°C en humitat controlada.

- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir l'anticòs és anti-IgG1 o anti-IgG2a de porc produït en ratolí (*BioRad*) diluït a 1/5,000.
- Incubar la placa durant 1 hora a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir l'anticòs peroxidasa anti-ratolí produït en cabra (*Sigma Aldrich*) diluït a 1/10,000.
- Incubar durant 30 minuts a 37°C en humitat controlada.
- Decantar el contingut de la placa i realitzar 3 rentats amb la solució de rentat.
- Afegir el tampó de detecció (TMB), el qual és el substrat cromogènic.
- Incubar la placa durant aproximadament 20 minuts a temperatura ambient en humitat controlada.
- Frenar la reacció afegint H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M abans que el control negatiu agafi color.
- Llegir la placa a 450nm (DO<sub>492</sub>) amb el lector ASYS UVM340.

### **7.12.3 Tècnica de neutralització de la infectivitat *in vitro* per a la quantificació dels títols d'anticossos anti-HAV neutralitzants**

La capacitat dels sèrums de neutralitzar la infectivitat *in vitro* de les dues soques d'HAV, HM175-L0 i HM175-HP, va ser caracteritzada mitjançant la tècnica de neutralització de la infectivitat *in vitro*. A mode de control negatiu de l'assaig de neutralització es va utilitzar sèrums del grup control negatiu. Es van seguir els següents passos:

- Lisar el virus amb un 3% de NP40 tal i com es detalla en l'apartat 7.10.1.
- Diluir el sèrum de ratolí i l'HAV en un volum final de 100µl de MEM 0% i a una concentració final del virus de  $10^5$  TCID<sub>50</sub>. Per a cada sèrum s'assagen les dilucions 1:50 i 1:100.
- Incubar la mix durant 3 hores a 37°C en agitació.
- Titulació de cada una de les suspensions víriques tal i com es descriu en l'apartat 7.1.7.

Un cop obtingut el títol víric per a cada una de les suspensions víriques assajades, la neutralització de la infectivitat *in vitro* d'HAV s'expressava com a índex de neutralització (IN). L'IN s'entén com el logaritme decimal de la reducció del títol del control negatiu ( $N_c$ ) respecte al títol del sèrum ( $N_s$ ); ( $IN = \text{Log}_{10}(N_c - N_s)$ ). Aquest valor ens indica quin és el número de virus afectats per la neutralització. La capacitat de neutralització es pot també expressar com el  $\text{Log}_{10}$  del nombre d'unitat per ml de sèrum capaços de neutralitzar el 50%, 70% o 90% de  $1 \times 10^5$  unitats TCID<sub>50</sub> en un 50% de les rèpliques ( $\text{Log}_{10} 50N_{50}$  U/ml,  $\text{Log}_{10} 70N_{50}$  U/ml,  $\text{Log}_{10} 90N_{50}$  U/ml, respectivament).

### 7.13 Anàlisi estadístic

Les dades es presenten com a mitjanes  $\pm$  error estàndard. El test de Shapiro-Wilk es va utilitzar per analitzar la distribució normal de les variables ( $p > 0,05$ ) i el Brown-Forsythe es va utilitzar com a prova de variàncies iguals ( $p > 0,05$ ). Es va realitzar la prova *t-student* (*unpaired* de dues cues) per comparar parells de resultats. L'anàlisi estadístic es va realitzar a un nivell de confiança del 95%. Tots els anàlisis i gràfics estadístics es van realitzar utilitzant el programari SigmaPlot v14.



## **8. BIBLIOGRAFIA**



1. Cockayne EA. Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *QJM*. 1912;6:1–29.
2. Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(1):38–58
3. Findlay GM, Dunlop JL, and Brown HC. Observations on epidemic catarrhal jaundice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1931;25:7–28.
4. Havens WP. Experiment in Cross Immunity Between Infectious Hepatitis and Homologous Serum Jaundice. *Exp Biol Med*. 1945; 59:148–150.
5. MacCallum FO. Homologous serum jaundice. Vol. 1, *British Medical Bulletin*. 1943. p. 114–5.
6. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science*. 1979;182(4116):1026–8
7. Gust ID, Lehmann NI, Crowe S, Mc Crorie M, Locarnini SA, Lucas CR. The origin of the HM175 strain of hepatitis A virus. *J Infect Dis*. 1985;151(2):365–7.
8. Cohen JI, Rosenblum B, Feinstone SM, Ticehurst J, Purcell RH. Attenuation and cell culture adaptation of hepatitis A virus (HAV): a genetic analysis with HAV cDNA. *J Virol*. 1989;63(12):5364–70.
9. Cromeans T, Sobsey MD, Fields HA. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J Med Virol*. 1987;22(1):45–56.
10. Melnick JL. Classification of Hepatitis A Virus as Enterovirus Type 72 and of Hepatitis B Virus as Hepadnavirus Type 1. *Intervirology*. 1982;18(3):105–6.
11. ICTV (2011). *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses*. The 9th Report of the ICTV. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/)
12. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*. 2013;496(7445):367–71.



13. Feng Z, Hirai-Yuki A, McKnight KL, Lemon SM. Naked Viruses That Aren't Always Naked: Quasi-Enveloped Agents of Acute Hepatitis. *Annu Rev Virol.* 2014;1(1):539–60.
14. Vaughan G, Goncalves Rossi LM, Forbi JC, de Paula VS, Purdy MA, Xia G, et al. Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect, Genet and Evol.* 2014; 21:227–43.
15. Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: From discovery to vaccines *Hepatology.* 2006; 43:164-72.
16. Pintó RM, Aragonès L, Costafreda MI, Ribes E, Bosch A. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res.* 2007;127(2):158–63.
17. Pintó RM, Pérez-Rodríguez FJ, Costafreda MI, Chavarria-Miró G, Guix S, Ribes E, et al. Pathogenicity and virulence of hepatitis A virus. *Virulence.* 2021;12(1):1174–85.
18. Aguirre S, Malirat V, Scodeller E, Mattion N. First full-length genomic sequence of a hepatitis A virus isolated in Argentina shows recombination between subgenotypes IA and IB. *Virus Res.* 2011;155(1):316–24.
19. McKnight KL, Lemon SM. Hepatitis A Virus Genome Organization and Replication Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(12).
20. Vives-Adrián L, Garriga D, Buxaderas M, Fraga J, Pereira PJB, Macedo-Ribeiro S, et al. Structural Basis for Host Membrane Remodeling Induced by Protein 2B of Hepatitis A Virus. *J Virol.*;89(7):3648.
21. Zhang B, Morace G, Gauss-Müller V, Kusov Y. Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(17):5975.
22. D'Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, De Castellarnau M, Guix S, Ribes E, Quer J, et al. The Critical Role of Codon Composition on the Translation Efficiency Robustness of the Hepatitis A Virus Capsid. *Genome Biol Evol.* 2019;11(9):2439–56.
23. Pintó RM, Pérez-Rodríguez FJ, D'andrea L, de Castellarnau M, Guix S, Bosch A. Hepatitis A Virus Codon Usage: Implications for Translation Kinetics and Capsid Folding. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(10).

24. Varenne S, Buc J, Llobes R, Lazdunski C. Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. *J Mol Biol* [Internet]. 1984;180(3):549–76.
25. Adzhubei AA, Adzhubei IA, Krasheninnikov IA, Neidle S. Non-random usage of “degenerate” codons is related to protein three-dimensional structure. *FEBS Lett*. 1996;399(1–2):78–82.
26. Sanchez G, Bosch A, Pinto RM. Genome Variability and Capsid Structural Constraints of Hepatitis A Virus. *J Virol*. 2003;77(1):452–9.
27. Stuart DI, Ren J, Wang X, Rao Z, Fry EE. Hepatitis a virus capsid structure. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(5).
28. Lemon SM, Ott JJ, Van Damme P, Shouval D. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *Journal of Hepatology*. 2018;68:167–84.
29. Stapleton JT, Raina V, Winokur PL, Walters K, Klinzman D, Rosen E, et al. Antigenic and immunogenic properties of recombinant hepatitis A virus 14S and 70S subviral particles. *J Virol*. 1993;67(2):1080.
30. Wang X, Ren J, Gao Q, Hu Z, Sun Y, Li X, et al. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature*. 2015;517(7532):85–8.
31. Kristensen T, Belsham GJ. Identification of plasticity and interactions of a highly conserved motif within a picornavirus capsid precursor required for virus infectivity. *Sci Rep*. 2019;9(1).
32. Yu JM, Li LL, Zhang CY, Lu S, Ao YY, Gao HC, et al. A novel hepatovirus identified in wild woodchuck *Marmota himalayana*. *Sci Rep*. 2016;6:22361.
33. de Oliveira Carneiro I, Sander AL, Silva N, Moreira-Soto A, Normann A, Flehmig B, et al. A Novel Marsupial Hepatitis A Virus Corroborates Complex Evolutionary Patterns Shaping the Genus Hepatovirus. *J Virol*. 2018;92(13).
34. Anthony SJ, Leger JAS, Liang E, Hicks AL, Sanchez Leon MD, Jain K, et al. Discovery of a novel hepatovirus (Phopivirus of seals) related to human hepatitis A virus. *mBio*. 2015;6(4).
35. Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol*. 199;66(4):2208–16.

36. Nainan O V., Brinton MA, Margolis HS. Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis a virus. *Virology*. 1992;191(2):984-7.
37. Aragonès L, Bosch A, Pintó RM. Hepatitis A Virus Mutant Spectra under the Selective Pressure of Monoclonal Antibodies: Codon Usage Constraints Limit Capsid Variability. *J Virol*. 2008;82(4):1688.
38. Cox, E.M., Emerson, S.U. & Lemon SM. Use of oligonucleotide-direct mutagenesis to define the immunodominant neutralization site of HAV: Vaccines 90: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1991;169-73.
39. Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of escape mutants selected against murine monoclonal antibodies. *J Virol*. 1992;66(4):2208-16.
40. Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J, Sala R, Barrabeig I, Bosch A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: circulation of newly emerging strains. *J Clin Virol [Internet]*. 2011;52(2):98-102.
41. Wang X, Zhu L, Dang M, Hu Z, Gao Q, Yuan S, et al. Potent neutralization of hepatitis A virus reveals a receptor mimic mechanism and the receptor recognition site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(4):770-5.
42. Cristina J, Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of Hepatitis A virus. *Virus Res*- 2007;127(2):151-7.
43. Coudray-Meunier C, Fraisse A, Mokhtari C, Martin-Latil S, Roque-Afonso AM, Perelle S. Hepatitis A virus subgenotyping based on RT-qPCR assays. *BMC Microbiol*. 2014;14(1).
44. Asher LVS, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassell RA, Young GD. Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J Med Virol*. 1995;47(3):260-8.
45. Mathiesen LR, Drucker J, Lorenz D, Wagner JA, Gerety RJ, Purcell RH. Localization of hepatitis A antigen in marmoset organs during acute infection with hepatitis A virus. *J Infect Dis*. 1978;138(3):369-77.
46. Blank CA, Anderson DA, Beard M, Lemon SM. Infection of Polarized Cultures of Human Intestinal Epithelial Cells with Hepatitis A Virus: Vectorial Release of Progeny Virions through Apical Cellular Membranes. *J Virol*. 2000;74(14):6476-84.

47. Ouzilou L, Caliot E, Pelletier I, Prévost MC, Pringault E, Colbère-Garapin F. Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J Gen Virol.* 2002;83:2177–82.
48. Dotzauer A, Brenner M, Gebhardt U, Vallbracht A. IgA-coated particles of Hepatitis A virus are translocalized antivectorially from the apical to the basolateral site of polarized epithelial cells via the polymeric immunoglobulin receptor. *J Gen Virol.* 2005;86:2747–51.
49. Dotzauer A, Gebhardt U, Bieback K, Göttke U, Kracke A, Mages J, et al. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Virol.* 2000;74(23):10950–7.
50. Dotzauer A, Heitmann A, Laue T, Kraemer L, Schwabe K, Paulmann D, et al. The role of immunoglobulin A in prolonged and relapsing hepatitis A virus infections. *J Gen Virol.* 2012;93:754–60.
51. Feng Z, Lemon SM. Peek-a-boo: membrane hijacking and the pathogenesis of viral hepatitis. *Trends Microbiol.* 2014;22(2):59.
52. Walker CM, Feng Z, Lemon SM. Reassessing immune control of hepatitis A virus. *Curr Opin Virol.* 2015;11:7–13.
53. Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol.* 1998;72(8):6621–8.
54. Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 1996;15(16):4282–4296.
55. Sui L, Li N, Zhang W, Chen Y, Zheng Y, Wan T, et al. Human membrane protein Tim-3 facilitates hepatitis A virus entry into target cells. *Int J Mol Med.* 2006;17(6):1093–9.
56. Feng Z, Li Y, McKnight KL, Hensley L, Lanford RE, Walker CM, et al. Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J Clin Invest.* 2015;125(1):169–76.
57. Das A, Hirai-Yuki A, González-López O, Rhein B, Moller-Tank S, Brouillette R, et al. TIM1 (HAVCR1) Is Not Essential for Cellular Entry of Either Quasi-enveloped or Naked Hepatitis A Virions. *mBio.* 2017;8(5).

58. Costafreda MI, Kaplan G. HAVCR1 (CD365) and Its Mouse Ortholog Are Functional Hepatitis A Virus (HAV) Cellular Receptors That Mediate HAV Infection. *J Virol*;92(9).
59. Rivera-Serrano EE, González-López O, Das A, Lemon SM. Cellular entry and uncoating of naked and quasi-enveloped human hepatoviruses. *Elife*. 2019;8.
60. Bishop NE, Anderson DA. Uncoating kinetics of hepatitis A virus virions and provirions. *J Virol*. 2000;74(7):3423–6.
61. Costafreda MI, Pérez-Rodríguez FJ, D'Andrea L, Guix S, Ribes E, Bosch A, et al. Hepatitis A Virus Adaptation to Cellular Shutoff Is Driven by Dynamic Adjustments of Codon Usage and Results in the Selection of Populations with Altered Capsids. *J Virol*. 2014;88(9):5029.
62. Das A, Barrientos R, Shiota T, Madigan V, Misumi I, McKnight KL, et al. Gangliosides are essential endosomal receptors for quasi-enveloped and naked hepatitis A virus. *Nature Microbiology*. 2020;5(9):1069–78.
63. Costafreda MI, Abbasi A, Lu H, Kaplan G. Exosome mimicry by a HAVCR1–NPC1 pathway of endosomal fusion mediates hepatitis A virus infection. *Nature Microbiology* 2020 5:9. 2020;5(9):1096–106.
64. Tesar M, Jia XY, Summers DF, Ehrenfeld E. Analysis of a Potential Myristoylation Site in Hepatitis A Virus Capsid Protein VP4. *Virology*. 1993;194(2):616–26.
65. Shukla A, Padhi AK, Gomes J, Banerjee M. The VP4 peptide of hepatitis A virus ruptures membranes through formation of discrete pores. *J Virol*. 2014;88(21):12409–21.
66. Brown EA, Zajac AJ, Lemon SM. *In vitro* characterization of an internal ribosomal entry site (IRES) present within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: comparison with the IRES of encephalomyocarditis virus. *J Virol*. 1994;68(2):1066–74.
67. Whetter LE, Day SP, Elroy-Stein O, Brown EA, Lemon SM. Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J Virol*. 1994;68(8):5253–63.
68. Racaniello VR. 2016. Picornaviridae: The Viruses and their Replication. *Basicmedical Key*. <https://basicmedicalkey.com/picornaviridae-the-viruses-and-their-replication/>

69. Gosert R, Cassinotti P, Siegl G, Weitz M. Identification of hepatitis A virus non-structural protein 2B and its release by the major virus protease 3C. *J Gen Virol.* 1996;77(2):247–55.
70. Martin A, Escriou N, Chao SF, Girard M, Lemon SM, Wychowski C. Identification and site-directed mutagenesis of the primary (2A/2B) cleavage site of the hepatitis A virus polyprotein: functional impact on the infectivity of HAV RNA transcripts. *Virology.* 1995;213(1):213–22.
71. Bruce AM, Sherman MC, David AJ, Jennifer RST, Kent BT, Robert R, et al. Expression and characterization of recombinant hepatitis A virus 3C proteinase. *Biochemistry.* 1992;31(13):3358–63.
72. Anderson DA, Ross BC. Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. *J Virol.* 1990;64(11):5284–9.
73. D M, G M, M G, S van der W. Lack of myristoylation of poliovirus capsid polypeptide VP0 prevents the formation of virions or results in the assembly of noninfectious virus particles. *J Virol.* 1990;64(9):4099–107.
74. Abrams CC, King AMQ, Belsham GJ. Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol.* 1995;76(12):3089–98.
75. Nugent CI, Kirkegaard K. RNA binding properties of poliovirus subviral particles. *J Virol.* 1995;69(1):13–22.
76. Verlinden Y, Cuconati A, Wimmer E, Rombaut B. Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA. *J Gen Virol.* 2000;81(11):2751–4.
77. Jiang P, Liu Y, Ma HC, Paul A V., Wimmer E. Picornavirus morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):418–37.
78. Graff J, Richards OC, Swiderek KM, Davis MT, Rusnak F, Harmon SA, et al. Hepatitis A Virus Capsid Protein VP1 Has a Heterogeneous C Terminus. *J Virol.* 1999;73(7):6015.
79. Bishop NE, Anderson DA. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. *Virology.* 1993;197(2):616–23.
80. Gosert R, Egger D, Bienz K. A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology.* 2000;266(1):157–69.

81. Teterina NL, Bienz K, Egger D, Gorbalenya AE, Ehrenfeld E. Induction of intracellular membrane rearrangements by HAV proteins 2C and 2BC. *Virology*. 1997;237(1):66–77.
82. Yang Y, Liang Y, Qu L, Chen Z, Yi MK, Li K, et al. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(17):7253–8.
83. Yang Y, Yi M, Evans DJ, Simmonds P, Lemon SM. Identification of a conserved RNA replication element (cre) within the 3Dpol-coding sequence of hepatoviruses. *J Virol*. 2008;82(20):10118–28.
84. Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:337–62.
85. McKnight KL, Xie L, González-López O, Rivera-Serrano EE, Chen X, Lemon SM. Protein composition of the hepatitis A virus quasi-envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(25):6587–92.
86. Van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213–28.
87. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* 2019 9:1.;9(1):1–18.
88. Thakur A, Parra DC, Motalebnejad P, Brocchi M, Chen HJ. Exosomes: Small vesicles with big roles in cancer, vaccine development, and therapeutics. *Bioact Mater*. 2022;10:281–94.
89. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* . 2014;30:255–89.
90. Crenshaw BJ, Gu L, Sims B, Matthews QL. Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *Open Virol J*. 2018;12(1):134–48.
91. Borchardt RT. Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T.: Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability, Gastroenterology, 96, 736–749, 1989—The Backstory. *AAPS J*. 2011;13(3):323.
92. Snooks MJ, Bhat P, Mackenzie J, Counihan NA, Vaughan N, Anderson DA. Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. *J Virol*. 2008;82(17):8733–42.

93. Hirai-Yuki A, Hensley L, Whitmire JK, Lemona SM. Biliary Secretion of Quasi-Enveloped Human Hepatitis A Virus. *mBio*. 2016;7(6).
94. Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell*. 2006;22(5):561–9.
95. Fensterl V, Grotheer D, Berk I, Schlemminger S, Vallbracht A, Dotzauer A. Hepatitis A Virus Suppresses RIG-I-Mediated IRF-3 Activation To Block Induction of Beta Interferon. *J Virol*. 2005;79(17):10968.
96. Qu L, Feng Z, Yamane D, Liang Y, Lanford RE, Li K, et al. Disruption of TLR3 Signaling Due to Cleavage of TRIF by the Hepatitis A Virus Protease-Polymerase Processing Intermediate, 3CD. *PLoS Pathog*. 2011;7(9).
97. Brack K, Berk I, Magulski T, Lederer J, Dotzauer A, Vallbracht A. Hepatitis A Virus Inhibits Cellular Antiviral Defense Mechanisms Induced by Double-Stranded RNA. *J Virol*. 2002;76(23):11920.
98. Lanford RE, Feng Z, Chavez D, Guerra B, Brasky KM, Zhou Y, et al. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(27):11223–8.
99. Wang D, Fang L, Wei D, Zhang H, Luo R, Chen H, et al. Hepatitis A Virus 3C Protease Cleaves NEMO To Impair Induction of Beta Interferon. *J Virol*. 2014;88(17):10252–8.
100. Mo L, Zeng Z, Deng R, Li Z, Sun J, Hu N, et al. Hepatitis A virus-induced hsa-miR-146a-5p attenuates IFN- $\beta$  signaling by targeting adaptor protein TRAF6. *Arch Virol*. 2021;166(3):789–99.
101. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology* 2008;8(8):594–606.
102. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:163–83.
103. Lemon SM, Binn LN. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. *J Infect Dis*. 1983;148(6):1033–9.
104. Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis*. 1995;171.



105. Kao HW, Ashcavai M, Redeker AG. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. *Hepatology*. 1984;4(5):933–6.
106. Flehmig B, Zahn J, Vallbracht A. Levels of neutralizing and binding antibodies to hepatitis-A virus after onset of icterus: a comparison. *J Infect Dis*. 1984;150(3):461.
107. Locarnini SA, Coulepis AG, Kaldor J, Gust ID. Coproantibodies in hepatitis A: detection by enzyme-linked immunosorbent assay and immune electron microscopy. *J Clin Microbiol*. 1980;11(6):710–6.
108. Pintó RM, D’Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, Costafreda MI, Ribes E, Guix S, et al. Hepatitis A virus evolution and the potential emergence of new variants escaping the presently available vaccines. *Future Microbiol*. 2012;7(3):331–46.
109. Guidotti LG, Chisari F V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:23–61.
110. Zhou Y, Callendret B, Xu D, Brasky KM, Feng Z, Hensley LL, et al. Dominance of the CD4+ T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(8):1481–92.
111. Choi YS, Jung MK, Lee J, Choi SJ, Choi SH, Lee HW, et al. Tumor Necrosis Factor-producing T-regulatory Cells are Associated With Severe Liver Injury in Patients With Acute Hepatitis A. *Gastroenterology*. 2018;154(4):1047.
112. Manangeeswaran M, Jacques J, Tami C, Konduru K, Amharref N, Perrella O, et al. Binding of hepatitis A virus to its cellular receptor 1 inhibits T-regulatory cell functions in humans. *Gastroenterology*. 2012;142(7).
113. D’Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, de Castellarnau M, Manzanares S, Lite J, Guix S, et al. Hepatitis A virus genotype distribution during a decade of universal vaccination of preadolescents. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):6842–54.
114. Lemon SM. Type A viral hepatitis. New developments in an old disease. *N Engl J Med*. 1985;313(17):1059–67.
115. Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, Redfield RR, Fields ML, Kelley PW. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infections in adults. *Am J Epidemiol*. 1985;122(2):226–33.

116. Koff RS. Clinical manifestations and diagnosis of hepatitis A virus infection. *Vaccine*. 1992;10.
117. Armstrong GL, Bell BP. Hepatitis A virus infections in the United States: model-based estimates and implications for childhood immunization. *Pediatrics*. 2002;109(5):839–45.
118. Koff RS. Hepatitis A. *Lancet*. 1998;351(9116):1643–9.
119. Leon LAA, De Almeida AJ, De Paula VS, Tourinho RS, Villela DAM, Gaspar AMC, et al. Longitudinal Study of Hepatitis A Infection by Saliva Sampling: The Kinetics of HAV Markers in Saliva Revealed the Application of Saliva Tests for Hepatitis A Study. *PLoS One*. 2015;10(12).
120. Richardson M, Elliman D, Maguire H, Simpson J, Nicoll A. Evidence base of incubation periods, periods of infectiousness and exclusion policies for the control of communicable diseases in schools and preschools. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20(4):380–91.
121. Schiff ER. Atypical clinical manifestations of hepatitis A. *Vaccine*. 1992;10.
122. Sjogren MH, Tanno H, Fay O, Sileoni S, Cohen BD, Burke DS, et al. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann Intern Med*. 1987;106(2):221–6.
123. Glikson M, Galun E, Oren R, Tur-Kaspa R, Shouval D. Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine*. 1992;71(1):14–23.
124. Fagan EA, Williams R. Fulminant viral hepatitis. *Br Med Bull*. 1990;46(2):462–80.
125. Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med*. 1993;329(25):1862–72.
126. Rezende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, Gigou M, Nicand E, Ferre V, et al. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology*. 2003;38(3):613–8.
127. Lee HW, Chang DY, Moon HJ, Chang HY, Shin EC, Lee JS, et al. Clinical Factors and Viral Load Influencing Severity of Acute Hepatitis A. *PLoS One*. 2015;10(6).
128. Kemmer NM, Miskovsky EP. Hepatitis A. *Infect Dis Clin North Am*. 2000;14(3):605–15.
129. Elinav E, Ben-Dov IZ, Shapira Y, Daudi N, Adler R, Shouval D, et al. Acute hepatitis A infection in pregnancy is associated with high rates of

- gestational complications and preterm labor. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1129–34.
130. Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;156(1):107–11.
131. Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(10):3704.
132. Pintó RM, Pérez-Rodríguez FJ, D'andrea L, de Castellarnau M, Guix S, Bosch A. Hepatitis A Virus Codon Usage: Implications for Translation Kinetics and Capsid Folding. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(10).
133. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP); Fiore AE, Wasley A, Bell BP. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2006;55(RR-7):1-23
134. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2020. Hepatitis A - FAQs, Statistics, Data, Guideline. <https://www.cdc.gov/hepatitis/hav/index.htm>
135. Tjon G, Xiridou M, Coutinho R, Bruisten S. Different transmission patterns of hepatitis A virus for two main risk groups as evidenced by molecular cluster analysis. *J Med Virol*. 2007;79(5):488–94.
136. Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Lite J, Sala R, Barrabeig I, Bosch A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis A virus infections in Catalonia, Spain, 2005-2009: circulation of newly emerging strains. *J Clin Virol*. 2011;52(2):98–102.
137. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med*. 2015;12.
138. Domínguez A, Oviedo M, Carmona G, Jansá JM, Borrás E, Salleras L, et al. Epidemiology of hepatitis A before and after the introduction of a universal vaccination programme in Catalonia, Spain. *J Viral Hepat*. 2008;15:51–6.
139. WHO position paper on hepatitis A vaccines. *Weekly Epidemiological Record*, 2022;97:40.

140. Concise Medical Knowledge. 2022. Virus de la Hepatitis A. <https://www.lecturio.com/es/concepts/virus-de-la-hepatitis-a/>
141. Löscher T, Keystone JS, Steffen R. Vaccination of travelers against hepatitis A and B. *J Travel Med.* 1999;6(2):107–14.
142. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Hepatitis A - Annual Epidemiological Report for 2016. 2016. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hepatitis-annual-epidemiological-report-2016>
143. Sanofi. Hepatitis A. 2020. <https://www.sanofi.com/en/your-health/vaccines/hepatitis-a>
144. Sánchez G, Pintó RM, Vanaclocha H, Bosch A. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4148–55.
145. Pintó RM, Costafreda MI, Bosch A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(23):7350–5.
146. European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis A outbreak in the EU/EEA mostly affecting men who have sex with men.2018. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-2>.
147. Rodríguez-Tajes S, Perpiñán E, Caballol B, Lens S, Mariño Z, Costa J, et al. Hepatitis A outbreak in Barcelona among men who have sex with men (MSM), January-June 2017: A hospital perspective. *Liver International.* 2018;38(4):588–93.
148. Gozlan Y, Bar-Or I, Rakovsky A, Savion M, Amitai Z, Sheffer R, et al. Ongoing hepatitis A among men who have sex with men (MSM) linked to outbreaks in Europe in Tel Aviv area, Israel, December 2016 - June 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(29).
149. Freidl GS, Sonder GJ, Bovée LP, Friesema IH, van Rijckevorsel GG, Ruijs WL, et al. Hepatitis A outbreak among men who have sex with men (MSM) predominantly linked with the EuroPride, the Netherlands, July 2016 to February 2017. *Eurosurveillance.* 2017;22(8).
150. Ka 'Oihana Olakino. Hepatitis A Outbreak 2016. 2017 <https://health.hawaii.gov/docd/hepatitis-a-outbreak-2016/>

151. European food safety authority. EFSA. Tracing of food items in connection to the multinational hepatitis A virus outbreak in Europe. *EFSA Journal*. 2014;12(9).
152. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2013. FDA Investigates multistate outbreak of Hepatitis A illnesses associated with pomegranate seeds from Turkish importer. <http://wayback.archive-it.org/7993/20171114154929/https://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm354698.htm>
153. Kiyohara T, Ouchi Y, Hasegawa Y, Sato T, Yoneyama T, Ishii K, et al. An in-house-anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay: evaluation and application to an HAV outbreak. *J Med Virol*. 2009;81(9):1513–6.
154. Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Singh K. Changing spectrum of sporadic acute viral hepatitis in Indian children. *J Trop Pediatr*. 2002;48(4):210–3.
155. Lemon SM. Immunologic approaches to assessing the response to inactivated hepatitis A vaccine. *J Hepatol*. 1993;18.
156. De Paula VS, Villar LM, Morais LM, Lewis-Ximenez LL, Niel C, Gaspar AMC. Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection. *J Clin Virol*. 2004;29(4):254–9.
157. Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan O V., Siegl G, et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol*. 1992;73(6):1365–77.
158. Paula, V.S. Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virology*. 2012;7:461-472.
159. Tejada-Strop A, Costafreda MI, Dimitrova Z, Kaplan GG, Teo CG. Evaluation of Potencies of Immune Globulin Products Against Hepatitis A. *JAMA Intern Med*. 2017;177(3):430–2.
160. Liu JP, Nikolova D, Fei Y. Immunoglobulins for preventing hepatitis A. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(2).
161. Doshani M, Weng M, Moore KL, Romero JR, Nelson NP. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices for Use of Hepatitis A Vaccine for Persons Experiencing Homelessness. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68(6):153–6.

162. WHO. 2019. The Immunological Basis for Immunization Series: Module 18: Hepatitis A. <https://www.who.int/publications/i/item/97892516327>
163. Werzberger A, Mensch B, Kuter B, Brown L, Lewis J, Sitrin R, et al. A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. *N Engl J Med.* 1992;327(7):453-7.
164. Mao JS, Dong DX, Zhang HY, Chen NL, Zhang XY, Huang HY, et al. Primary study of attenuated live hepatitis A vaccine (H2 strain) in humans. *J Infect Dis.* 1989;159(4):621-4.
165. Almeida PH, Matiolo CEL, Curvelo LA, Rocco RA, Felga G, Guardia B Della, et al. Update on the management and treatment of viral hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2021;27(23):3249.
166. Pérez-Sautu U, Costafreda MI, Caylà J, Tortajada C, Lite J, Bosch A, et al. Hepatitis A Virus Vaccine Escape Variants and Potential New Serotype Emergence. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(4):734-7.
167. Debing Y, Neyts J, Thibaut HJ. Molecular biology and inhibitors of hepatitis A virus. *Med Res Rev.* 2014;34(5):895-917.
168. Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Nakamura M, Jiang X, Haga Y, et al. Direct-acting Antivirals and Host-targeting Agents against the Hepatitis A Virus. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3(3):205-10.
169. Lall M, Jain R, Vederas J. Inhibitors of 3C cysteine proteinases from Picornaviridae. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(12):1239-53.
170. Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Fujiwara K, Nagao K, Saisho H. Amantadine inhibits hepatitis A virus internal ribosomal entry site-mediated translation in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(2):621-9.
171. Chaudhary RK, Andonov AP. Effect of ribavirin on hepatitis A virus replication *in vitro*. *Can J Infect Dis.* 1992;3(2):67-70.
172. Esser-Nobis K, Harak C, Schult P, Kusov Y, Lohmann V. Novel perspectives for hepatitis A virus therapy revealed by comparative analysis of hepatitis C virus and hepatitis A virus RNA replication. *Hepatology.* 2015 ;62(2):397-408.

173. Li Y, Misumi I, Shiota T, Sun L, Lenarcic EM, Kim H, et al. The ZCCHC14/TENT4 complex is required for hepatitis A virus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(28).
174. Sun L, Zhang F, Guo F, Liu F, Kulsuptrakul J, Puschnik A, et al. The dihydroquinolizinone compound rg7834 inhibits the polyadenylase function of PAPD5 and PAPD7 and accelerates the degradation of matured hepatitis b virus surface protein mRNA. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(1).
175. Xu ZY, Wang XY. Live attenuated hepatitis A vaccines developed in China. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(3):659.
176. Cui F, Liang X, Wang F, Zheng H, Hutin YJ, Yang W. Development, production, and postmarketing surveillance of hepatitis A vaccines in China. *J Epidemiol*. 2014;24(3):169-77.
177. Sun X, Wang F, Zheng H, Miao N, Yuan Q, Cui F, et al. The impact of expanded program on immunization with live attenuated and inactivated Hepatitis A vaccines in China, 2004-2016. *Vaccine*. 2018;36(10):1279-84.
178. Glück R, Mischler R, Brantschen S, Just M, Althaus B, Cryz SJ. Immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90(6):2491-5.
179. Bovier PA. Epaxal®: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(8):1141-50.
180. Liu XE, Chen HY, Liao Z, Zhou Y, Wen H, Peng S, et al. Comparison of Immunogenicity Between Inactivated and Live Attenuated Hepatitis A Vaccines Among Young Adults: A 3-Year Follow-up Study. *J Infect Dis*. 2015;212(8):1232-6.
181. Proell S, Maiwald H, Nothdurft HD, Saenger R, Vollmar J, De Clercq N, et al. Combined vaccination against hepatitis A, hepatitis B, and typhoid fever: safety, reactogenicity, and immunogenicity. *J Travel Med*. 2002;9(3):122-6.
182. Gencat. Calendari de vacunacions. Canal Salut. 2023 <https://canalsalut.gencat.cat/ca/salut-a-z/v/vacunacions/calendari-de-vacunacions/>

183. Xu ZY, Wang XY. Live attenuated hepatitis A vaccines developed in China. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(3):659–66.
184. Zheng H, Chen Y, Wang F, Gong X, Wu Z, Miao N, et al. Comparing live attenuated and inactivated hepatitis A vaccines: an immunogenicity study after one single dose. *Vaccine*. 2011;29(48):9098–103.
185. Martínez A, Broner S, Torner N, Godoy P, Batalla J, Álvarez J, et al. Hepatitis A outbreaks in the vaccination era in Catalonia, Spain. *Hum Vaccin*. 2011; 7:205–10.
186. D'Andrea L, Pérez-Rodríguez FJ, de Castellarnau M, Manzanares S, Lite J, Guix S, et al. Hepatitis A Virus Genotype Distribution during a Decade of Universal Vaccination of Preadolescents. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):6842.
187. European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological update: outbreak of hepatitis A virus infection in four Nordic countries. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-outbreak-hepatitis-virus-infection-four-nordic-countries>
188. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of Hepatitis A, Linked to Pomegranate Seeds. 2013. <https://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2013/a1b-03-31/index.html>
189. Severi E, Verhoef L, Thornton L, Guzman-Herrador BR, Faber M, Sundqvist L, et al. Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. *Euro Surveill*. 2015;20(29).
190. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2016. Outbreak of hepatitis A in Hawaii linked to raw scallops <https://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2016/hav-hawaii.htm>
191. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of hepatitis A linked to frozen strawberries (Final Update). 2016. <https://www.cdc.gov/hepatitis/outbreaks/2016/hav-strawberries.htm>
192. FDA. U.S Food and Drug Administration. Outbreak Investigation of Hepatitis A Virus: Strawberries. 2022. <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-hepatitis-virus-strawberries-may-2022>
193. European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological update: Hepatitis A outbreak in the EU/EEA mostly affecting men who



- have sex with men. 2018. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-2>
194. Foster M, Ramachandran S, Myatt K, Donovan D, Bohm S, Fiedler J et al. Hepatitis A Virus Outbreaks Associated with Drug Use and Homelessness - California, Kentucky, Michigan, and Utah, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018;67(43):1208-1210.
195. Food Safety News. Hepatitis A outbreaks investigated in Ireland | Food Safety News. 2021.<https://www.foodsafetynews.com/2021/03/hepatitis-a-outbreaks-investigated-in-ireland/>
196. Asuni N. Hepatitis A vaccine shortage: implications and advice for clinical practice. 2015. <https://travelhealthpro.org.uk/news/225/hepatitis-a-vaccine-shortage-implications-and-advice-for-clinical-practice>
197. Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science.* 1949;109(2822):85-7.
198. Provost PJ, Hilleman MR. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1979;160(2):213-21.
199. Hollinger FB, Melnick JL, Robinson WS. Viral hepatitis: biological and clinical features, specific diagnosis, and prophylaxis. 1985;213.
200. Hilleman MR. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine.* 2000;18(15):1436-47.
201. Binn LN, Lemon SM, Marchwicki RH, Redfield RR, Gates NL, Bancroft WH. Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures. *J Clin Microbiol.* 1984;20(1):28-33.
202. Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun.* 1981;32(1):388-93.
203. Coulepis AG, Locarnini SA, Westaway EG, Tarnnock GA, Gust ID. Biophysical and Biochemical Characterization of Hepatitis A Virus. *Intervirology.* 1982;18(3):107-27.
204. Provost PJ, Giesa PA, McAleer WJ, Hilleman MR. Isolation of Hepatitis A Virus *in Vitro* in Cell Culture Directly from Human Specimens.

- Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1981;167(2):201-6.
205. Frösner GG, Deinhardt F, Scheid R, Gauss-Müller V, Holmes N, Messelberger V, Siegl G, Alexander JJ. Propagation of human hepatitis A virus in a hepatoma cell line. *Infection*. 1979;7(6):303-5
  206. Dotzauer A, Feinstone SM, Kaplan G. Susceptibility of nonprimate cell lines to hepatitis A virus infection. *J Virol*. 1994;68(9):6064-8.
  207. Feigelstock DA, Thompson P, Kaplan GG. Growth of Hepatitis A Virus in a Mouse Liver Cell Line. *J Virol*. 2005;79(5):2950.
  208. Flehmig B. Hepatitis A-virus in cell culture: I. Propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). *Med Microbiol Immunol*. 1980;168(4):239-48.
  209. Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect Immun*. 1981;32(1):388-93.
  210. Flehmig B. Hepatitis A-virus in cell culture: I. Propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). *Med Microbiol Immunol*. 1980;168(4):239-48.
  211. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*. 1970;227(5254):168-70.
  212. Funkhouser AW, Purcell RH, D'Hondt E, Emerson SU. Attenuated hepatitis A virus: genetic determinants of adaptation to growth in MRC-5 cells. *J Virol*. 1994;68(1):148-57.
  213. Provost PJ, Hughes J V., Miller WJ, Giesa PA, Banker FS, Emini EA. An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J Med Virol*. 1986;19(1):23-31.
  214. LaBrecque FD, LaBrecque DR, Klinzman D, Perlman S, Cederna JB, Winokur PL, et al. Recombinant hepatitis A virus antigen: improved production and utility in diagnostic immunoassays. *J Clin Microbiol*. 1998;36(7):2014-8.
  215. Schultz DE, Honda M, Whetter LE, McKnight KL, Lemon SM. Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol*. 1996;70(2):1041-9.

216. Day SP, Murphy P, Brown EA, Lemon SM. Mutations within the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA which enhance replication in BS-C-1 cells. *J Virol.* 1992;66(11):6533–40.
217. Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T, et al. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: evidence for genetic recombination. *J Virol.* 1991;65(4):2056.
218. Brack K, Frings W, Dotzauer A, Vallbracht A. A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus. *J Virol.* 1998;72(4):3370–6.
219. Konduru K, Kaplan GG. Stable Growth of Wild-Type Hepatitis A Virus in Cell Culture. *J Virol.* 2006;80(3):1352.
220. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol.* 2012;10(12).
221. Hurley JH. ESCRTs are everywhere. *EMBO J.* 2015;34(19):2398.
222. Hurley JH, Odorizzi G. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol.* 2012;14(7):654–5.
223. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012;14(7):677–85.
224. Zimmermann P, Meerschaert K, Reekmans G, Leenaerts I, Small JV, Vandekerckhove J, et al. PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell.* 2002;9(6):1215–25.
225. González-López O, Rivera-Serrano EE, Hu F, Hensley L, McKnight KL, Ren J, et al. Redundant Late Domain Functions of Tandem VP2 YPX 3 L Motifs in Nonlytic Cellular Egress of Quasi-enveloped Hepatitis A Virus. *J Virol.* 2018;92(23).
226. Pires R, Hartlieb B, Signor L, Schoehn G, Lata S, Roessle M, et al. A crescent shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure.* 2009; 17(6):843.
227. Hurley JH, Odorizzi G. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2012;14(7):654–5.

228. Jiang W, Ma P, Deng L, Liu Z, Wang X, Liu X, et al. Hepatitis A virus structural protein pX interacts with ALIX and promotes the secretion of virions and foreign proteins through exosome-like vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1).
229. Shirasaki T, Feng H, Duyvesteyn HME, Fusco WG, McKnight KL, Xie L, et al. Nonlytic cellular release of hepatitis A virus requires dual capsid recruitment of the ESCRT-associated Bro1 domain proteins HD-PTP and ALIX. *PLoS Pathog*. 2022;18(8).
230. Ichioka F, Kobayashi R, Katoh K, Shibata H, Maki M. Brox, a novel farnesylated Bro1 domain-containing protein that associates with charged multivesicular body protein 4 (CHMP4). *FEBS J*. 2008;275(4):682–92. 4658.2007.06230.x
231. Pérez-Rodríguez FJ, D'Andrea L, De Castellarnau M, Costafreda MI, Guix S, Ribes E, et al. Improving virus production through quasispecies genomic selection and molecular breeding. *Scientific Reports*. 2016;6(1):1–12.
232. Homma Y, Hiragi S, Fukuda M. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J*. 2021;288(1):36.
233. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(8):513–25.
234. Jin H, Tang Y, Yang L, Peng X, Li B, Fan Q, et al. Rab GTPases: Central Coordinators of Membrane Trafficking in Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9.
235. Vitelli R, Santillo M, Lattero D, Chiariello M, Bifulco M, Bruni CB, et al. Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem*. 1997;272(7):4391–7.
236. Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci*. 2002;115:2505–15.
237. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):19–30.
238. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura SI, Manrique-Hoyos N, Jung SY, Lauterbach MA, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *Journal of Cell Biology*. 2010;189(2):223–32.

239. Blanc L, Vidal M. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases*. 2017;9(1-2):95-106.
240. Bruce EA, Stuart A, McCaffrey MW, Digard P. Role of the Rab11 pathway in negative-strand virus assembly. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(6):1409-15.
241. Amorim MJ, Bruce EA, Read EKC, Foeglein Á, Mahen R, Stuart AD, et al. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J Virol*. 2011;85(9):4143-56.
242. Einfeld AJ, Kawakami E, Watanabe T, Neumann G, Kawaoka Y. RAB11A Is Essential for Transport of the Influenza Virus Genome to the Plasma Membrane. *J Virol*. 2011;85(13):6117-26.
243. Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, et al. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS One*. 2011;6(6).
244. Rowe RK, Suszko JW, Pekosz A. Roles for the recycling endosome, Rab8, and Rab11 in hantavirus release from epithelial cells. *Virology*. 2008;382(2):239-49.
245. Utley TJ, Ducharme NA, Varthakavi V, Shepherd BE, Santangelo PJ, Lindquist ME, et al. Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(29):10209.
246. Chambers R, Takimoto T. Trafficking of Sendai virus nucleocapsids is mediated by intracellular vesicles. *PLoS One*. 2010;5(6).
247. Fraile-Ramos A, Cepeda V, Elstak E, van der Sluijs P. Rab27a Is Required for Human Cytomegalovirus Assembly. *PLoS One*. 2010;5(12).
248. Gerber PP, Cabrini M, Jancic C, Paoletti L, Banchio C, Bilderling C von, et al. Rab27a controls HIV-1 assembly by regulating plasma membrane levels of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Biol*. 2015;209(3):435-52.
249. Bello-Morales R, Crespillo AJ, Fraile-Ramos A, Tabarés E, Alcina A, López-Guerrero JA. Role of the small GTPase Rab27a during herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells. *BMC Microbiol*. 2012;12.

250. Caillet M, Janvier K, Pelchen-Matthews A, Delcroix-Genête D, Camus G, Marsh M, et al. Rab7A Is Required for Efficient Production of Infectious HIV-1. *PLoS Pathog.* 2011;7(11).
251. Treyer A, Müsch A. Hepatocyte Polarity. *Compr Physiol.* 2013;3(1):243.
252. Schulze RJ, Schott MB, Casey CA, Tuma PL, McNiven MA. The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *J Cell Biol.* 2019;218(7):2096–112.
253. Boyer JL. Bile Formation and Secretion. *Compr Physiol.* 2013;3(3):1035.
254. Counihan NA, Anderson DA. Specific IgA Enhances the Transcytosis and Excretion of Hepatitis A Virus. *Scientific Reports* 2016 6:1. 2016;6(1):1–9.
255. Gissen P, Arias IM. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol.* 2015;63(4):1023–37.
256. Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, et al. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature.* 2013;496(7445):367–71.
257. Belouzard S, Danneels A, Fénéant L, Séron K, Rouillé Y, Dubuisson J. Entry and Release of Hepatitis C Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol* [Internet]. 2017;91(18).
258. Sainz B, Tencate V, Uprichard SL. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virology.* 2009;6.
259. Molina-Jimenez F, Benedicto I, Dao Thi VL, Gondar V, Lavillette D, Marin JJ, et al. Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. *Virology.* 2012;425(1):31–9.
260. Hawash MBF, Sanz-Remón J, Grenier JC, Kohn J, Yotova V, Johnson Z, et al. Primate innate immune responses to bacterial and viral pathogens reveals an evolutionary trade-off between strength and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(13).
261. Feng Z, Li Y, McKnight KL, Hensley L, Lanford RE, Walker CM, et al. Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. *J Clin Invest.* 2015;125(1):169–76.

262. Takahashi K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P, Isogawa M, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(16):7431–6.
263. Ortega D, Pol A, Biermer M, Jackle S, Enrich C. Annexin VI defines an apical endocytic compartment in rat liver hepatocytes. *J Cell Sci*. 1998;111(2):261–9.
264. Lemon SM, Whetter L, Chang KH, Brown EA. Why do human hepatitis viruses replicate so poorly in cell cultures? *FEMS Microbiol Lett*. 1992;100(1–3):455–9.
265. Aragonès L, Guix S, Ribes E, Bosch A, Pintó RM. Fine-Tuning Translation Kinetics Selection as the Driving Force of Codon Usage Bias in the Hepatitis A Virus Capsid. Andino R, editor. *PLoS Pathog*. 2010;6(3)
266. Kanda T, Sasaki R, Masuzaki R, Matsumoto N, Ogawa M, Moriyama M. Cell Culture Systems and Drug Targets for Hepatitis A Virus Infection. *Viruses*. 2020;12(5).
267. Chen P, Zhang KH, Na T, Wang L, Yin WD, Yuan BZ, et al. The hUC-MSCs cell line CCRC-1 represents a novel, safe and high-yielding HDCs for the production of human viral vaccines. *Scientific Reports* 2017 7:1. 2017;7(1):1–13.
268. Andreani NA, Renzi S, Piovani G, Ajmone Marsan P, Bomba L, Villa R, et al. Potential neoplastic evolution of Vero cells: *in vivo* and *in vitro* characterization. *Cytotechnology*. 2017;69(5):741–50.
269. Bishop NE, Hugo DL, Borovec S v., Anderson DA. Rapid and efficient purification of hepatitis A virus from cell culture. *J Virol Methods*. 1994;47(1–2):203–16.
270. Dotti S, Lombardo T, Villa R, Cacciamali A, Zanotti C, Andreani NA, et al. Transformation and Tumorigenicity Testing of Simian Cell Lines and Evaluation of Poliovirus Replication. *PLoS One*. 2017;12(1).
271. Provost PJ, Giesa PA, Buynak EB, Mclean AA, Scolnick EM. Fetal rhesus kidney cells used for hepatitis A viral vaccine development are free from polyomavirus. *Lancet*. 1984;1(8373):395.
272. Klug B, Robertson JS, Condit RC, Seligman SJ, Laderoute MP, Sheets R, et al. Adventitious agents and live viral vectored vaccines: Considerations

- for archiving samples of biological materials for retrospective analysis. *Vaccine*. 2016;34(51):6617–25.
273. Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, Janssen H, Divecha N, Dusseljee S, et al. Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol*. 1999;9(1):55–8.
274. Juhász G, Hill JH, Yan Y, Sass M, Baehrecke EH, Backer JM, et al. The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2008;181(4):655–66.
275. Xiang K, Wang B. Role of the PI3K AKT mTOR pathway in hepatitis B virus infection and replication. *Mol Med Rep*. 2018;17(3):4713–9.
276. Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. *Front Immunol*. 2014;5(AUG).
277. Blommaert EFC, Krause U, Schellens JPM, Vreeling-Sindelárová H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1997;243(1–2):240–6.
278. Holleran JL, Egorin MJ, Zuhowski EG, Parise RA, Musser SM, Pan SS. Use of high-performance liquid chromatography to characterize the rapid decomposition of wortmannin in tissue culture media. *Anal Biochem*. 2003;323(1):19–25.
279. InvivoGen. 2022. Vaccine Adjuvants Review. <https://www.invivogen.com/review-vaccine-adjuvants>
280. Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol*. 2009 Aug 1;21(4):242–53.
281. O'Hagan DT, Fox CB. New generation adjuvants--from empiricism to rational design. *Vaccine*. 2015;33 14-20.
282. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003;8(3):223-46.
283. Fierro NA, Castro-Garcia FP, Panduro A. Rethinking cytokine function during hepatitis A and hepatitis C infections. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2013;2013(07):13–8.



284. Zhou Y, Callendret B, Xu D, Brasky KM, Feng Z, Hensley LL, et al. Dominance of the CD4(+) T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection. *J Exp Med*. 2012;209(8):1481–92.
285. Ebensen T, Delandre S, Prochnow B, Guzmán CA, Schulze K. The Combination Vaccine Adjuvant System Alum/c-di-AMP Results in Quantitative and Qualitative Enhanced Immune Responses Post Immunization. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9.
286. Djuricic S, Jakobsen JC, Petersen SB, Kenfelt M, Klingenberg SL, Gluud C. Aluminium adjuvants used in vaccines. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(7).
287. Pogostin BH, McHugh KJ. Novel Vaccine Adjuvants as Key Tools for Improving Pandemic Preparedness. *Bioengineering (Basel)*. 2021;8(11).
288. van Dissel JT, Joosten SA, Hoff ST, Soonawala D, Prins C, Hokey DA, et al. A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived Mycobacterium tuberculosis-specific T-cell responses in human. *Vaccine*. 2014;32(52):7098–107.
289. Gram GJ, Karlsson I, Agger EM, Andersen P, Fomsgaard A. A Novel Liposome-Based Adjuvant CAF01 for Induction of CD8 + Cytotoxic T-Lymphocytes (CTL) to HIV-1 Minimal CTL Peptides in HLA-A\*0201 Transgenic Mice. *PLoS One*. 2009;11:4(9)
290. Nouatin O, Ibáñez J, Fendel R, Ngoa UA, Lorenz FR, Dejon-Agobé JC, et al. Cellular and antibody response in GMZ2-vaccinated Gabonese volunteers in a controlled human malaria infection trial. *Malar J*. 2022;21(1):1–16.
291. Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*. 2022;8
292. Langer R, Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*. 1976;263(5580):797–800.
293. Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *N Biotechnol*. 2017;39(Pt B):174–80.
294. Alonso F, Domínguez J, Viñuela E, Revilla Y. African swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the 32 kDa immediate early protein (vp32). *Virus Res*. 1997;49(2):123–30.
295. Costafreda MI, Ribes E, Franch À, Bosch A, Pintó RM. A Single Mutation in the Glycophorin A Binding Site of Hepatitis A Virus Enhances Virus

- Clearance from the Blood and Results in a Lower Fitness Variant. *J Virol.* 2012;86(15):7887. A
296. Van Herck K, Van Damme P. Prevention of hepatitis A by Havrix<sup>TM</sup>: a review. 2014;4(4):459–71.
297. Davidson M, Krugman S, Sandman LA. Inactivated hepatitis A vaccine: a safety and immunogenicity study in health professionals. *Vaccine.* 1992;10
298. Bailey M, Christoforidou Z, Lewis MC. The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;152(1–2):13–9.
299. Gerdts V, Wilson HL, Meurens F, Van den Hurk S van DL, Wilson D, Walker S, et al. Large Animal Models for Vaccine Development and Testing. *ILAR J.* 2015;56(1):53–62.
300. Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol Rev.* 2006;28(1):101–11.
301. Li SW, Zhao Q, Wu T, Chen S, Zhang J, Xia NS. The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(4):908–14.
302. Roose K, Baets S De, Schepens B, Saelens X. Hepatitis B core-based virus-like particles to present heterologous epitopes. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(2):183–98.
303. Wang JW, Roden RBS. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(2):129–41.
304. Federico M. From virus-like particles to engineered exosomes for a new generation of vaccines. 2012;7(5):473–82.
305. Lemon SM, Murphy PC, Provost PJ, Chalikonda I, Davide JP, Schofield TL, et al. Immunoprecipitation and Virus Neutralization Assays Demonstrate Qualitative Differences between Protective Antibody Responses to Inactivated Hepatitis A Vaccine and Passive Immunization with Immune Globulin. *J Infect Dis.* 1997;176(1):9–19.
306. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. *Nature.* 1970;227(5254):168–70.

307. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr Protoc Microbiol.* 2008:Appendix.
308. Wallace RE, Vasington PJ, Petriccioni JC, Hopps HE, Lorenz DE, Kadanka Z. Development and characterization of cell lines from subhuman primates. *In Vitro.* 1973;8(5):333–41.
309. Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):3846–55.
310. Haimes JD, Kelley M. 2015. Demonstration of a  $\Delta\Delta Cq$  Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data 2015. Horizon Inspired Cell Solutions.
311. Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem.* 2007;40(4):101–11.
312. Sarkar I, Garg R, van Drunen Littel-van den Hurk S. Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens. *Expert Rev Vaccines.* 2019;18(5):505.



